

**Retroviral modifizierte, alloantigen-spezifische und vIL-10
transgene T-Lymphozyten als therapeutischer Ansatz im akuten
Abstoßungsmodell**

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

doctorum rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie
eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
der Humboldt-Universität zu Berlin
von

Diplom-Biologin Christine Brandt
geboren am 28.03.1969 in Einbeck

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin
Prof. Dr. Jürgen Mlynek

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Prof. Dr. Michael Linscheid

Gutachter: 1. Prof. Dr. H.-D. Volk
 2. Prof. Dr. R. Lucius
 3. Prof. Dr. W. Uckert

Tag der mündlichen Prüfung: 11. Juli 2003

1	ZUSAMMENFASSUNG	5
2	EINLEITUNG	7
2.1	Transplantation und Rejektion	7
2.2	Immunsuppressiva	9
2.3	Die spezifische Immunantwort in der Transplantation.....	10
2.3.1	T-Zell Aktivierung und Kostimulatorische Moleküle	10
2.3.2	Effektormechanismen der T-Lymphozyten.....	11
2.3.3	Th1 versus Th2	13
2.3.4	Direkte und indirekte Antigenerkennung	15
2.3.5	Migration von T-Lymphozyten	16
2.4	Toleranz	17
2.5	Gentherapeutische Ansätze in der Transplantation.....	20
2.5.1	Virale Expressionssysteme in der Gentherapie	24
2.5.2	Verpackungszelllinien für Retroviren.....	25
2.5.3	T-Zellen als Vektoren in der Gentherapie.....	27
2.6	Virales Interleukin-10 als immunmodulatorisches Molekül	29
3	AUFGABEN- UND ZIELSTELLUNG.....	31
4	MATERIAL UND METHODEN	32
4.1	Material.....	32
4.1.1	Allgemeine technische Geräte	32
4.1.2	Geräte und Material für die Zellkultur	32
4.1.3	Geräte und Material für die Molekularbiologie und Biochemie	32
4.1.4	Chemikalien.....	33
4.1.5	Versuchssysteme (Kits).....	34
4.1.6	Enzyme.....	34
4.1.7	Antikörper und Membranfarbstoffe	34
4.1.8	Anästhetika	34
4.1.9	Zelllinien	34
4.1.10	Rattenstämme	34
4.1.11	Bakterienstämme.....	34
4.1.12	Expressionsvektoren	35

4.1.13	Puffer und Medien	35
4.2	Methoden	36
4.2.1	Klonierung von vIL-10 in den retroviralen Expressionsvektor pLXSN.....	36
4.2.1.1	Auftrennung der DNA-Fragmente mittels Agarosegelelektrophorese	36
4.2.1.2	Isolierung von DNA aus Agarosegelen mit Glasmilch.....	36
4.2.1.3	Ligation von vIL-10 in den retroviralen pLXSN-Vektor.....	36
4.2.1.4	Kulturbedien und Agarplatten für Bakterien.....	37
4.2.1.5	Transformation von E. coli.....	37
4.2.1.6	Konservieren von Bakterienkolonien.....	37
4.2.1.7	DNA-Präparation	38
4.2.2	Herstellung der virusproduzierende Verpackungszelllinie GP+E vIL-10	38
4.2.2.1	Kalzium-Phosphat Transfektion	39
4.2.2.2	Tunikamycinbehandlung und Infektion	40
4.2.2.3	Limited Dilution und Titerbestimmung	40
4.2.3	Generierung der vIL-10 transgenen, allospezifischen T-Zelllinie (T _{vIL-10} - Lymphozyten)	41
4.2.3.1	Präparation des lymphatischen Gewebes	41
4.2.3.2	Gewinnung des autologen Serums.....	41
4.2.3.3	Aufarbeitung der lymphatischen Gewebe	41
4.2.3.4	Retrovirale Transduktion der Lymphozyten in der gemischten Lymphozytenkultur (MLC, mixed lymphocyte reaction)	42
4.2.3.5	Restimulationen der T _{vIL-10} -Lymphozyten.....	42
4.2.3.6	Aufreinigung der T _{vIL-10} -Lymphozyten.....	43
4.2.3.7	Herstellung allospezifischer T _{EGFP} -Lymphozyten und T _{MOCK} -Lymphozyten.....	44
4.2.3.8	Biologischer Aktivitätstest für vIL-10	44
4.2.4	Zytokinexpressionsuntersuchungen auf mRNA- und Protein-Ebene in der MLC	45
4.2.4.1	Zellkulturansatz	45
4.2.4.2	Proteinbestimmung	45
4.2.4.3	mRNA-Analytik mittels Real-Time TaqMan PCR.....	45
4.2.4.3.1	RNA-Isolation	45
4.2.4.3.2	cDNA-Synthese.....	45
4.2.4.3.3	TaqMan TM PCR.....	47
4.2.4.3.4	Relative Quantifizierung.....	49
4.2.5	Proliferations-Test in der MLC	50
4.2.6	Intrazelluläre IFN- γ Färbung in der MLC	51
4.2.7	Durchflußzytometrische Analysen der T _{vIL-10} -Lymphozyten.....	52
4.2.8	Einfluß von Cyclosporin A auf die Zytokinproduktion	52
4.2.9	Heterotrope Herztransplantation und adoptiver T-Zelltransfer	52
4.2.10	PKH 26 Markierung der T _{vIL-10} -Lymphozyten.....	53
4.2.11	Histologische Auswertung der PKH 26 markierten T _{vIL-10} -Lymphozyten.....	53
4.2.12	Cyclosporin A Behandlung im Transplantationsmodell	53
5	ERGEBNISSE	54
5.1	Generierung des retroviralen pLXSN vIL-10 Vektors.....	54

5.2	Generierung der retroviralen Verpackungszelllinie GP+E vIL-10	55
5.3	Bioaktivitätstest für vIL-10	58
5.4	Generierung der retroviral modifizierten, alloantigen spezifischen T-Zelllinie (T_{vIL-10}-Lymphozyten)	59
5.5	Charakterisierung der T_{vIL-10}-Lymphozyten	60
5.6	Funktionstests der T_{vIL-10}-Lymphozyten <i>in vitro</i>	65
5.6.1	Einfluss der T _{vIL-10} -Lymphozyten auf die Proliferation naiver T-Zellen.....	65
5.6.2	Einfluss der T _{vIL-10} -Lymphozyten auf die IFN- γ Produktion naiver T-Zellen	68
5.7	Migrations- und Funktionsanalysen der T_{vIL-10}-Lymphozyten nach adoptivem Transfer im allogenen Herz-Transplantationsmodell.....	71
5.7.1	Untersuchung zur Gewebeverteilung der <i>ex vivo</i> generierten T-Lymphozyten in den Organen	71
5.7.2	Transplantatüberlebenszeiten nach adoptivem T-Zell Transfer	75
5.7.3	Auswirkung von Cyclosporin A auf die vIL-10 und IFN- γ Expression der transgenen Zellen <i>in vitro</i>	76
5.7.4	Kombinationstherapie von Cyclosporin A und adoptivem Transfer von T _{vIL-10} -Lymphozyten <i>in vivo</i>	79
6	DISKUSSION.....	80
6.1	T-Lymphozyten als Zielzellen für die Genexpression in das Transplantat	81
6.2	Generierung vIL-10 produzierender T-Zellen	82
6.3	Einfluss von vIL-10 auf die transduzierte Zelllinie	83
6.4	Wirkung und Wirkungsmechanismen der T_{vIL-10}-Lymphozyten <i>in vitro</i>	84
6.5	Wirkung der T_{vIL-10}-Lymphozyten <i>in vivo</i>	86
6.5.1	Adoptiver Transfer im Herztransplantationsmodell	86
6.5.2	Kombinationstherapie: Cy A und T _{vIL-10} -Lymphozyten	87
6.5.3	Problematik von Dosis und Wirkung von vIL-10.	89
6.5.4	Zeitliche Applikation und Wirkungsmechanismus von vIL-10.	89
6.5.5	Th1 Phänotyp der T _{vIL-10} -Lymphozyten.....	90
6.5.6	Alloreaktivität und Zytotoxizität der T _{vIL-10} -Lymphozyten.	91
6.6	Gentherapie und Biosicherheit.....	91

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	93
LITERATURVERZEICHNIS.....	95
ANHANG	107
Publikationen und Kongressteilnahmen.....	107
Lebenslauf.....	109
Danksagung	110
Selbstständigkeitserklärung.....	112

1 Zusammenfassung

Die allogene Organabstoßung stellt trotz des Einsatzes von modernen Immunsuppressiva das zentrale Problem in der Transplantationsmedizin dar. In den letzten Jahrzehnten intensiver Forschung ist deutlich geworden, dass $CD4^+$ Lymphozyten eine bedeutende Rolle bei der spezifischen Transplantatabstoßung spielen. Die frühzeitige Inhibierung der Entstehung von Transplantat-infiltrierenden $CD4^+$ Lymphozyten kann folglich zu einer Verlängerung der Transplantatüberlebenszeit oder sogar zur Toleranz führen. Die Entstehung und Aktivierung dieser Zellen findet im regionalen Lymphknoten (LN) und im Transplantat (Tx) statt. Durch die lokale Überexpression von immuninhibitorischen und immunmodulatorischen Molekülen kann die Entstehung und Aktivierung dieser Transplantat-infiltrierenden $CD4^+$ Zellen inhibiert werden. In vorangegangenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass alloantigen-spezifische T-Lymphozyten ein geeignetes Transportvehikel für fluoreszierende Marker-Moleküle darstellen. Es konnte sowohl ein allospezifisches Migrationsverhalten dieser Zellen, als auch eine Expressionssteigerung des Reportergens unter alloantigen-spezifischer T-Zellaktivierung nachgewiesen werden. Aus diesem Grund stellt der adoptive Transfer von genetisch modifizierten und alloantigen-spezifischen T-Lymphozyten eine Möglichkeit dar, therapeutisch wirksame Proteine lokal zu exprimieren, und die Immunantwort des Transplantatempfängers dahingehend zu verändern, dass es zur Transplantatakzeptanz oder Toleranz gegenüber dem Spenderorgan kommt. In der vorliegenden Arbeit wurde an Stelle eines Marker-Proteins das immunmodulatorische Molekül virales Interleukin-10 (vIL-10) eingesetzt. Das vom Epstein-Barr-Virus abstammende Interleukin-10 Homolog wurde mittels retroviralen Gentransfer stabil in das Genom von alloantigen-spezifischen T-Lymphozyten integriert. Dazu wurde als erstes der retrovirale Vektor pLXSN-vIL-10 hergestellt und anschließend eine Verpackungszelllinie für die stabile Produktion eines vIL-10 transgenen Retrovirus generiert. Durch die Kokultivierung der Verpackungszelllinie mit einer gemischten Lymphozytenkultur (MLC), bestehend aus den „responder“ T-Zellen und bestrahlten, als Alloantigen dienenden T-Zellen, wurden alloantigen-spezifische und für vIL-10 transgene T-Zellen generiert. Über mehrere Restimulations- und Selektionsschritte erfolgte die Herstellung einer spezifischen und das Transgen stabil exprimierenden T-Zelllinie (T_{vIL-10}-Lymphozyten). Ein Vergleich der T_{vIL-10}-Lymphozyten mit T_{EGFP}-Lymphozyten und einer nicht transgenen T-Zelllinie (T_{MOCK}-Lymphozyten) als Kontrollen ergab keine signifikanten Unterschiede im Zytokinexpressionsmuster auf Protein- und RNA-Ebene, so dass der Th1 Phänotyp der T-

Lymphozyten durch die virale Transduktion und Expression von vIL-10 nicht verändert wurde. Der Phänotyp der T_{vIL-10}-Lymphozyten (IL-10⁺, IFN-γ⁺, CD25⁺, IL-4⁻) ähnelt dem von regulatorischen T-Zellen. Das immunmodulatorische Potential der T_{vIL-10}-Lymphozyten konnte zunächst *in vitro* nachgewiesen werden. Sowohl die Proliferation als auch die IFN-γ Produktion von naiven Lymphozyten konnte durch die Kokultivierung mit T_{vIL-10}-Lymphozyten und gleichzeitiger allogener Stimulation signifikant verringert werden. Die Aktivierung von Transplantat-infiltrierenden CD4⁺ T-Lymphozyten und deren klonale Proliferation geht einher mit einer hohen Expression von IFN-γ. Eine Inhibierung von IFN-γ führt folglich zu einer verminderten Alloreaktivität der T-Zellen. Im Anschluss an die erfolgreichen *in vitro* Experimente wurden die alloantigen-spezifischen T_{vIL-10}-Lymphozyten auf ihre Wirksamkeit in einem Ratten-Herz-Transplantationsmodell mittels adoptivem Transfer getestet. Eine erhöhte Einwanderung der T_{vIL-10}-Lymphozyten in das allogene Transplantat konnte nachgewiesen werden. Es konnte jedoch keine Verlängerung der Transplantatüberlebenszeit der heterotop transplantierten Herzen nach adoptivem Transfer von 15 Millionen T_{vIL-10} Lymphozyten erreicht werden. Auch der Einsatz einer suboptimalen, immunsuppressiven Kombinationstherapie mit Cyclosporin A (0,5 mg/kg Körpergewicht) und 3 bzw. 15 Millionen T_{vIL-10}Lymphozyten führte zu keiner Verlängerung der Transplantatüberlebenszeit. Warum die T_{vIL-10}-Lymphozyten ihr immunmodulatorisches Potential *in vitro*, aber nicht *in vivo* ausüben können, ist derzeit unklar und Gegenstand weiterer Untersuchungen.

Hypothese: Das entwickelte System zur Inhibierung bzw. Modulierung der allogenen Immunantwort durch die Überexpression von therapeutischen Molekülen, mittels retroviral modifizierter T-Lymphozyten, ist *in vitro* erfolgreich. Aber der Th1 Phänotyp der T_{vIL-10}-Lymphozyten inhibiert möglicherweise die Modulierung der Immunantwort *in vivo*. Die Entwicklung von T_{vIL-10}-Lymphozyten, die einen Th2 Phänotyp besitzen und somit weniger bzw. kein IFN-γ produzieren, verspricht Erfolge *in vivo*. Des weiteren sind ausführliche kinetische Untersuchungen zur zeitlichen Applikation der transgenen Zellen notwendig, um herauszufinden, wann die Anwesenheit von vIL-10 zu einen immunmodulatorischen Effekt in der initialen Immunantwort führt.

2 Einleitung

Die Transplantation von Geweben und Organen stellt heute bei Patienten mit irreversiblen Nieren-, Haut-, Herz-, Lungen, Kornea- und Leberschäden eine bedeutende therapeutische Option dar. Die Erfolge der Organtransplantation mit einem Patienten- und Transplantatüberleben von teilweise deutlich über 80% nach einem Jahr sind neben einer Verbesserung der operativen Technik, der Organkonservierung und der Patientenselektion vor allem auf den Einsatz von immunsuppressiv wirkenden Medikamenten zur Verhinderung der Transplantatabstoßung zurückzuführen (Ciancio et al, 2000). Diese Fortschritte in der modernen Transplantationsmedizin in den letzten 20 Jahren resultieren im wesentlichen aus den Erkenntnissen der Zusammenhänge von Aufbau und Funktionsmechanismen des menschlichen Immunsystems. Trotz der großen Erfolge ist das Problem der Transplantatabstoßung noch lange nicht zufriedenstellend gelöst. Zum einen führt der Einsatz der konventionellen Immunsuppression (Glukokortikoide, Calcineurinantagonisten, Proliferationshemmer) zur Schwächung des gesamten Immunsystems. Dadurch kann es zu Komplikationen mit opportunistischen viralen Infektionen (EBV, CMV), zur Manifestation von Tumoren oder zu toxischen Auswirkungen der Medikamente auf nichtimmunologische Organe kommen (Reinke et al, 1999; Penn, 2000). Zum anderen ist das Problem der chronischen Transplantatabstoßung nicht gelöst, so dass es zu keiner Verbesserung der Langzeitüberlebensraten der transplantierten Organe in den letzten Jahren gekommen ist (Tejani and Emmett, 2001). Die heutigen Behandlungsprotokolle in der Transplantationsmedizin führen lediglich zu einer Akzeptanz, nicht aber zu einer Toleranz des Spenderorgans. Ziel der Transplantationsforschung ist deshalb die Induktion einer spender-spezifischen lebenslangen Toleranz, bei der die Immunkompetenz des Empfängers erhalten bleibt.

2.1 Transplantation und Rejektion

Das Humane-Leukozyten-Antigen-System (HLA-System) des Menschen umfaßt ein komplexes System von Gewebeanitigenen (membranassoziierte Glykoproteine), die auf allen kernhaltigen Körperzellen unterschiedlich stark exprimiert werden. Verantwortlich für die genetische Kodierung des HLA-Systems, auch Major-Histokompatibilitätskomplex (MHC) genannt, sind Gene auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6. Auf Grund eines extremen genetischen Polymorphismus existiert eine ungeheuer große Anzahl verschiedener HLA-

Phänotypen. Die HLA-Antigene auf den Organzellen des Spenders sind die wichtigsten Auslöser einer allogen gerichteten Immunantwort des Transplantatempfängers. Die an der Immunantwort beteiligten T-Zellen erkennen dabei spenderstämmige Peptide in Assoziation mit auf dem Transplantat exprimierten MHC-Antigenen. Die Bindung von T-Zellen an körpereigene MHC-Moleküle führt in der Regel zu keiner immunologischen Reaktion, wohingegen die Erkennung von alloogenen MHC-Molekülen die Abstoßungsreaktion einleitet. Die Transplantatabstoßung wird auf Grund ihrer Geschwindigkeit, der Mediatoren und der beteiligten Zelltypen in 3 Stadien eingeteilt:

A) Die **hyperakute Abstoßung** setzt innerhalb von Minuten bis Stunden nach der Transplantation ein und führt in der Regel zu einem sofortigen und irreversiblen Organverlust (v.a. bei der Nierentransplantation). Sie beruht auf dem Vorhandensein von vorbestehenden Antikörpern der Klasse IgG und IgM beim Empfänger gegen Oberflächenantigene des Spendergewebes (Ito et al, 1984). Durch die Bindung dieser präformierten Antikörper an das Komplement findet eine Aktivierung der Komplementkaskade und damit eine Schädigung der Endothelzellauskleidung der Blutgefäße statt. Weiter ergibt sich eine intensive Infiltration des Spenderorgans durch polymorphkernige Leukozyten, die zur Bildung von Thromben und Nekrosen im Organ führt (Hernandez-Fuentes et al, 1999). Ursache ist oft ein vorangegangener Kontakt des Empfängers mit Fremdgewebe (Bluttransfusion, vorangegangene Transplantation, mehrfache Schwangerschaften), die zur Bildung entsprechender Antikörper und damit zu einer Sensibilisierung geführt haben. Eine hyperakute Abstoßung kann durch eine Kreuztestung verhindert werden, in der das Serum des Empfängers auf die Anwesenheit von zytotoxischen Antispenderantikörpern untersucht wird. Damit ist diese Abstoßungsform heute sehr selten geworden.

B) Die **akute Abstoßung** ist die typische, T-Zell-vermittelte Immunantwort, die am häufigsten zwischen der 2. und 6. Woche nach Transplantation auftritt. Sie wird ausgelöst durch die Alloantigenerkennung der empfänger-eigenen T-Lymphozyten, die als Folge dieses Kontaktes eine komplexe Kaskade von Effektormechanismen hervorruft. Eine wesentliche Rolle spielen dabei Botenstoffe (sogenannte Interleukine), die der Signalübermittlung von aktivierten Lymphozyten zu weiteren Abwehrzellen dienen und die damit einen wichtigen Angriffspunkt für die immunsuppressive Therapie darstellen. Histologisch kommt es bei der akuten Abstoßung zu einer massiven Infiltration von mononukleären Empfängerzellen in das Transplantat, welche zu einer beginnenden Gewebsschädigung führt. Die akute Abstoßung

kann heutzutage durch die Kombination geeigneter Medikamente in vielen Fällen vollständig verhindert werden. Eine Schwächung des Immunsystems durch die Immunsuppressiva und die damit verbundenen Komplikationen ist jedoch unumgänglich.

C) Die **chronische Abstoßung** tritt viele Monate oder sogar erst Jahre nach einer Transplantation auf und führt zu einer allmählichen Funktionsverschlechterung. Mikroskopisch findet man dabei unter anderem Verdickungen und Vernarbungen der kleinen Blutgefäße und der Glomerula (Niere) bzw. einen Verlust der Gallenwege (Leber), auch Herz und Lunge sind besonders von der vaskulären Abstoßungsform bedroht. Die genauen Mechanismen sind noch nicht vollständig erforscht. Diskutiert werden antigen-unabhängige und antigen-abhängige Mechanismen, die zur Vaskularisierung der Organe führen (Orosz and Pelletier, 1997). Weiter bestehen Zusammenhänge zwischen früheren akuten und späteren chronischen Abstoßungen, dem Grad der Vorschädigung des Transplantates (Spenderalter, Ischämiebelastung), der Vorbelastung des Transplantatempfängers mit bestimmten Virusinfektionen (CMV), sowie bestimmten Medikamenten, um nur einige Einflussgrößen zu nennen (Weis and von Scheidt, 1997). Insgesamt ist heute die chronische Abstoßung für den größten Teil der Transplantatverluste nach erfolgreicher Transplantation verantwortlich. Es gibt derzeit noch keine befriedigende Therapiemöglichkeit dafür.

2.2 Immunsuppressiva

Die neueren Immunsuppressiva nehmen einen selektiven Einfluss auf die Funktion des Immunsystems, indem sie die Bildung und Wirkung von Interleukinen verhindern, die Proliferation der T-Zellen verhindern, zur Antigenerkennung erforderliche Rezeptoren blockieren oder auf den intrazellulären Stoffwechsel der aktivierten T-Zellen einwirken. Besonders die Calcineurininhibitoren (Cyclosporin A, FK506) werden in der Transplantationsmedizin verstärkt eingesetzt. Es handelt sich um aus Pilzen gewonnene Substanzen, die eine ähnliche pharmakologische Aktivität besitzen. Insbesondere durch die Einführung des Cyclosporin A, ein zyklisches Decapeptid, ist es zu einer sprunghaften Verbesserung der Transplantationserfolge gekommen. Das Medikament führt zu einer Verminderung der Expression von Zytokinen, unter anderem der IL-2-Produktion, welches als Wachstumssignal für T-Zellen fungiert und eine Schlüsselfunktion in der Frühphase des Abstoßungsgeschehens besitzt. Der Wirkungsmechanismus wird vermittelt durch die Inhibierung der Phosphatase Calcineurin. Die Bindung von Cyclosporin A an Immunophiline

resultiert in der Inaktivierung des Transkriptionsfaktors NFAT, welcher unter anderem die Transkription des IL-2 Gens steuert. Neben dieser sehr erwünschten Wirkung haben die Calcineurininhibitoren jedoch auch ein relevantes Toxizitätsprofil, vor allem können sie eine Störung der Nierenfunktion, Neurotoxizität, Hyperkaliämie und Hypertension bewirken (Dunn et al, 2001).

In den meisten Transplantationszentren werden heutzutage Kombinationstherapien mit verschiedenen Vertretern von Immunsuppressiva durchgeführt. Dadurch lassen sich im günstigen Fall die erwünschten immunsuppressiven Eigenschaften addieren, während die Toxizitäten der einzelnen Substanzen begrenzt werden können.

2.3 Die spezifische Immunantwort in der Transplantation

2.3.1 T-Zell Aktivierung und Kostimulatorische Moleküle

Die Aktivierung naiver T-Zellen durch professionelle antigenpräsentierende Zellen (APCs) ist der entscheidende erste Schritt der adaptiven Immunantwort. Die Erkennung eines Antigens erfolgt im Kontext mit dem MHC-Molekül über den T-Zell Rezeptor (Auchincloss and Sultan, 1996). Man unterscheidet zwei Typen von MHC-Antigenen . Klasse-I-Moleküle (HLA-A,-B,-C) werden konstitutiv auf allen kernhaltigen Zellen exprimiert. Über sie findet im wesentlichen die Präsentation von intrazellulären Peptiden von Pathogenen statt, welche anschließend an den T-Zell-Rezeptor von $CD8^+$ T-Zellen binden können. Neuere Untersuchungen zeigen, dass eine Aktivierung der $CD8^+$ T-Zellen ebenso über professionelle APCs, die extrazelluläre Antigene von nicht-lymphatischen Geweben in Assoziation mit dem MHC I Molekül präsentieren, möglich ist. Dieser Mechanismus wird als „cross-presentation“ bezeichnet (Williams et al, 2002). Er ermöglicht dem Immunsystem, auf Mikroorganismen zu reagieren, die ausschließlich nicht-lymphatische Gewebe infizieren. Klasse-II-Moleküle (HLA-DR,-DQ) werden vorwiegend konstitutiv auf der Oberfläche von APCs, aber auch von aktivierten Endothelzellen exprimiert. Als professionelle APCs fungieren dendritische Zellen (DC), B-Lymphozyten, Langerhans-Zellen und Monozyten / Makrophagen. Antigene, die von aufgenommenen extrazellulären Erregern oder Toxinen stammen, werden nach der Phagozytose und proteolytischen Degradation von MHC-II-Molekülen an der Zelloberfläche präsentiert. Über den MHC-II-Antigen-Komplex findet die Aktivierung von $CD4^+$ Zellen statt. Die Expressionshöhe der MHC-Moleküle kann durch Zytokine wie $IFN-\gamma$ erhöht werden. Die Bindung des T-Zell Rezeptors an das entsprechende Antigen in Kontext mit dem MHC-

Molekül wird als antigen-spezifisches Signal 1 der T-Zell Aktivierung bezeichnet. Zur vollständigen Aktivierung einer T-Zelle mit klonaler Proliferation und Differenzierung ist ein weiteres, nicht antigen-spezifisches, kostimulatorisches Signal 2 notwendig (Frauwirth and Thompson, 2002). Die am besten charakterisierten kostimulatorischen Signale werden über B7.1 (CD80), B7.2 (CD86) auf den APCs und CD28 auf der T-Zelle, bzw. die CD40/ CD40L Interaktion vermittelt (Sharpe and Freeman, 2002). Erst die Kombination von Signal 1 und Signal 2 führt zur Aktivierung verschiedener zellulärer Transkriptionsfaktoren (NFAT, NFκB), welche wiederum zur verstärkten Synthese von Interleukin-2 (IL-2) beitragen (Shannon et al, 1995). Der T-Zell Wachstumsfaktor IL-2 bindet autokrin an den hochaffinen Interleukin-2 Rezeptor (IL-2R) und verstärkt die Aktivierung und Proliferation der aktivierten T-Zellen (Waldmann, 1993).

2.3.2 Effektormechanismen der T-Lymphozyten

Die spezifische Aktivierung der T-Lymphozyten spielt bei der initialen Abstoßungsreaktion eine zentrale Rolle. Nacktmäuse (Mäuse ohne reife T-Zellen) oder neonatal thymektomierte Ratten stoßen Transplantate nicht ab (Pennycuik, 1971). Bei jedem dieser Tiere kann die Fähigkeit zur Gewebsabstoßung mit der Inokulation von T-Zellen desselben Stammes wiederhergestellt werden (Kindred, 1974). Des weiteren wird die kritische Rolle der T-Lymphozyten durch die Tatsache verdeutlicht, dass die Depletion von CD3-positiven Zellen durch OKT3 (monoklonaler Antikörper gegen CD3) das Transplantat vor der Abstoßung schützt (Ode-Hakim et al, 1996). Studien mit CD4 bzw. CD8 T-Zell-depletierten Mäusen haben gezeigt, dass eine Abstoßung nur bei CD8 Depletion möglich ist (Campos et al, 1995). Dies lässt den Schluss zu, dass die T-Helfer-Zellen (Th-Zellen) die Initiatoren der Rejektion sind. Eine naive CD4⁺ T-Zelle differenziert sich nach ihrer spezifischen Aktivierung über den MHC-II-Antigen-Komplex zur unreifen Effektor T-Zelle (Th0) (Liew, 2002). Diese Zellen produzieren Zytokine wie z.B. IL-2, IFN-γ und IL-4, die zur Stimulation der Effektormechanismen erforderlich sind. Aber auch andere Zellen des Immunsystems (Gedächtniszellen, Mast-Zellen, NK-Zellen, aktivierte Makrophagen) können diese Zytokine nach ihrer Aktivierung sekretieren. Die gebildeten Zytokine wirken parakrin auf CD8⁺ T-Lymphozyten, Makrophagen und B-Lymphozyten, indem sie ihre Proliferation und Differenzierung fördern. Naive CD8⁺ T-Zellen können auch direkt über professionelle APCs („cross-presentation“) und unabhängig von einer CD4⁺ T-Zell-Hilfe aktiviert werden, IL-2 zu

produzieren (Vasilakos and Michael, 1993). Dieses wirkt autokrin auf die Proliferation und Differenzierung der $CD8^+$ T-Zelle und trägt somit zur Entstehung von zytotoxischen Effektor T-Zellen bei. Dazu benötigen die Zellen jedoch eine hohe Präsenz an kostimulatorischen Molekülen auf den APCs. Auch hohe Dosen von Selbst-Antigenen können über APCs „cross-präsentiert“ werden, welches nicht zu einer Autoimmunität, sondern zu einem Antigen-induzierten Zelltod der $CD8^+$ T-Zellen führt (Miller et al, 1998). Geringe Dosen an Selbst-Antigenen werden nicht „cross-präsentiert“. Der zytotoxische Effekt von $CD8^+$ T-Lymphozyten nach Antigenerkennung kann über zwei Mechanismen vermittelt werden. Zum einen über die Bildung von lytischen Proteinen wie Granzymen und Perforin, und zum anderen über die Bindung des auf aktivierten zytotoxischen T-Zellen exprimierten Fas-Liganden an seinen Rezeptor Fas (Russell and Ley, 2002). Fas wird konstitutiv oder nach Aktivierung auf vielen Zellen exprimiert. Beide Mechanismen führen zur Apoptose der Zielzelle. Eine weitere Möglichkeit der Vermittlung von Effektorfunktionen durch zytotoxische $CD8^+$ T-Lymphozyten ist die Ausschüttung von Zytokinen, z.B. $IFN-\gamma$ (Pathan et al, 2000). Auf die $CD4^+$ T-Zellen wirken die von Th0-Zellen synthetisierten Zytokine autokrin, indem sie ihre Differenzierung in Th1- oder Th2-Zellen fördern. Th1-Zellen zeichnen sich durch ein Zytokinprofil mit der Produktion von IL-2, $IFN-\gamma$ und $TNF-\alpha$ aus, welche wiederum Makrophagen aktivieren können und zur B-Zell abhängigen Produktion von opsonierenden Antikörpern führen. Es kommt zu einer zellvermittelten Entzündungsreaktion. Aktivierte Makrophagen und Endothelzellen wiederum können über die Produktion von Zytokinen zu der „Delayed-Type-Hypersensitivity“ (DTH)-Reaktion führen, eine der wichtigsten von $CD4^+$ T-Lymphozyten induzierten Effektormechanismen (Lowry et al, 1996). Ausgehend vom Th1/Th2 Paradigma sind in der frühen Phase der Abstoßung hauptsächlich Th1 Zellen beteiligt (Mosmann et al, 1989). Die Aktivierung von Th2 Zellen führt zu einer vermehrten Produktion von IL-4, IL-5, IL-6 und IL-13. Dadurch wird die Entstehung einer humoralen Immunantwort gefördert, einhergehend mit der Bildung von neutralisierenden Antikörpern durch aktivierte B-Zellen (Romagnani, 1991). Neben den Helfer- und Effektorfunktionen der $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Lymphozyten besitzen diese Zellen eine Gedächtnis- und eine regulatorische Funktion. Die Gedächtnisfunktion wird durch eine schnelle Aktivierung der Immunantwort nach erneutem Antigenkontakt vermittelt. Regulatorisch können diese T-Lymphozyten die Immunantwort inhibieren oder aktivieren über die Synthese anti-inflammatorischer bzw. regulatorischer Zytokine (IL-10, $TGF-\beta$) oder

die Expression von regulatorisch wirkenden kostimulatorischen Molekülen, z. B. CTLA-4 und ICOS (Shevach et al, 2001). Der CTLA-4 Rezeptor auf der T-Zelle besitzt eine höhere Affinität zu B7.1 und B7.2 als CD28 und verhindert als negativer Regulator eine chronische Stimulation der T-Zellen (Perez et al, 1997). ICOS hingegen induziert eine höhere IL-10 Produktion und erhöht somit die humorale Immunantwort (Hutloff et al, 1999). Neue Studien zeigen, dass die ICOS-Ligand Expression auf Endothelzellen zu einer verstärkten Sezernierung von Th1 und Th2 Zytokinen durch CD4⁺ Gedächtnis-T-Zellen führt (Khayyamian et al, 2002). Effektorzellen und Gedächtniszellen zeichnen sich im Besonderen dadurch aus, dass sie bei wiederholter Aktivierung auch ohne das kostimulatorische Signal 2 aktiviert werden können.

2.3.3 Th1 versus Th2

Bis zum heutigen Tag ist nicht vollständig geklärt, welche Mechanismen zur Ausbildung einer Th1 bzw. Th2 Immunantwort führen. Die Entdeckung von zwei unterschiedlichen T-Helfer Subpopulationen von Mosmann und Coffman im Jahr 1986 hat bis heute zahlreiche Fragen aufgeworfen. Es konnte gezeigt werden, dass Zytokine, die von Th1- (IFN- γ) bzw. Th2-Zellen (IL-4) produziert werden, einerseits eine autokrine Wirkung als Wachstumsfaktor zur weiteren Expansion der eigenen Zellpopulation besitzen und gleichzeitig als reziproke Inhibitoren auf den anderen Zelltyp wirken (Gajewski et al, 1988). Weiter konnte in den kommenden Jahren gezeigt werden, dass IL-4, gebildet von Gedächtnis-T-Zellen, NK-Zellen, Mast-Zellen oder eosinophilen Granulozyten essentiell ist für die Induktion von antigenspezifischen Th2-Zellen, abstammend von naiven Vorläufer T-Zellen (Swain et al, 1990). Neuere Erkenntnisse zeigen, dass die Entwicklung einer T-lymphozytären Th2 Antwort *in vivo* in kompletter Abwesenheit von IL-4 möglich ist (Ouyang et al, 2000; Finkelman et al, 2000). Für die Ausbildung einer Th1-Antwort ist IL-12, gebildet von aktivierten Makrophagen oder Dendritischen Zellen in Kombination mit der T-Zell-Rezeptor Aktivierung ausschlaggebend.

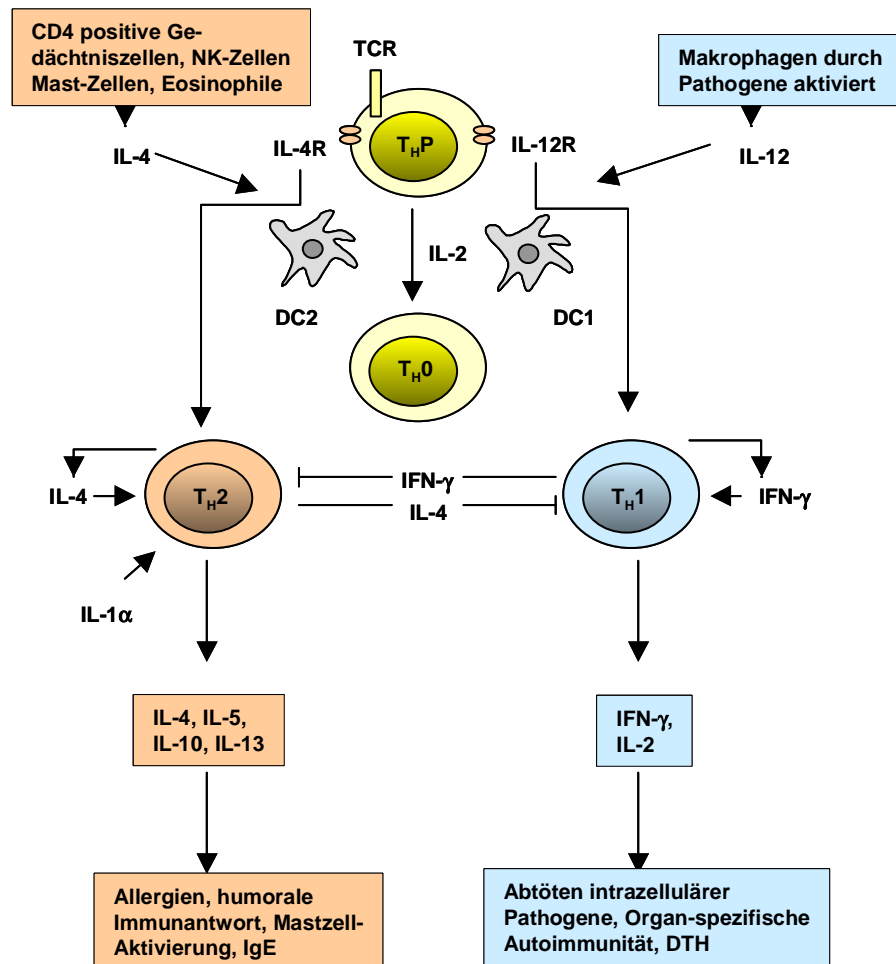


Abbildung 1: Th1 und Th2 Immunantwort verändert nach Liew, Nature Rev Immunol. 2002 (T_HP = Vorläufer T-Helferzelle, T_H0 = aktivierte, nicht polarisierte T-Helferzelle).

Durch zahlreiche klinische und experimentelle Untersuchungen liegen Hinweise vor, dass Th1 Zytokine eine Schlüsselrolle in der Pathogenese der akuten Transplantatabstoßung spielen. So konnte im Ratten-Modell gezeigt werden, dass die Th1 Zytokinexpression in Transplantaten nach Toleranzinduktion, vermittelt durch einen nicht-depletierenden anti-CD4 Antikörper, deutlich supprimiert ist (Siegling et al, 1994a; Lehmann et al, 1997). Der Mechanismus dieser Toleranzinduktion ist nicht völlig klar, vor allem da eine Depletion von CD4⁺ T-Zellen nicht notwendig ist. Welche Rolle die Th2 Zytokine bei der Transplantatabstoßung spielen, ist nicht geklärt. Bei toleranten Tieren kommt es durch die alleinige Th2-Antwort nicht zur Transplantatabstoßung. Inwieweit Th2 Zytokine regulativ oder suppressiv auf die Th1 Zytokinexpression und Transplantat-infiltrierenden Zellen einwirken können, ist Gegenstand

vieler Forschungsprojekte. Untersuchungen mit IL-4 zeigen widersprüchliche Ergebnisse und werden kontrovers diskutiert. So führt die Applikation von rekombinantem IL-4 zu einer starken Reduzierung der Frequenz von IFN- γ produzierenden Zellen (Merville et al, 1993). Der adenovirale Gentransfer in Transplantate führte aber in einigen Modellen nicht zur Verlängerung der Transplantatakzeptanz (Smith et al, 1997). Die Bedeutung der anti-inflammatorischen Zytokine IL-10 bzw. des ursprünglich aus EBV stammenden viralen Interleukin-10 (vIL-10) ist im Gegensatz zu IL-4 weniger umstritten. In unterschiedlichsten Modellen führt die virale oder nicht-virale Applikation der Zytokine zu einer Verlängerung der Transplantatüberlebenszeit (Qin et al, 1995, DeBruyne et al, 1998). Das größte Problem vieler Arbeiten zum Zytokingentransfer liegt in ihrer Applikation. Bedingt durch die kurze Halbwertszeit von Zytokinen im Serum, muss nach einer Möglichkeit gesucht werden, das therapeutische Molekül lokal und stabil zu exprimieren, um eine systemische Applikation und die damit verbundenen Nebenwirkungen zu verhindern.

2.3.4 Direkte und indirekte Antigenerkennung

Die Voraussetzung einer spezifischen T-Zell-vermittelten Immunantwort ist die vollständige Aktivierung der T-Lymphozyten zu alloreaktiven Effektor-T-Zellen. Diese können direkt an die allophenen MHC I Moleküle des Transplantates oder an die MHC II Moleküle des allophenen Endothels bzw. der mit dem Transplantat transferierten Spender-APCs binden. Die stärksten Stimulatoren der T-Zelle sind die APCs oder dendritischen Zellen, die nicht nur das Fremdpeptid präsentieren, sondern auch die kostimulatorischen Aktivitäten aufweisen (Croft, 1994). Des weiteren wird die Rolle des Endothels in der T-Zell Aktivierung diskutiert (Pober et al, 1996).

Die T-Zell Aktivierung kann durch zwei unterschiedliche Arten der Antigenpräsentation vermittelt werden. Die direkte Antigenpräsentation wird über Donor-APCs z.B. sogenannte „passenger“-Leukozyten (DC) oder aktivierte Endothelzellen vermittelt. Diese wandern, z.B. durch den Stress der Transplantation angeregt, aus dem Organ heraus, und migrieren zum regionalen Lymphknoten. Dabei kommt es zur Hochregulation der kostimulatorischen Moleküle. Im Lymphknoten findet das „priming“ der naiven Rezipienten T-Lymphozyten statt, die den entsprechenden T-Zell-Rezeptor tragen. Anschließend wandern die geprimten alloreaktiven T-Lymphozyten in das Transplantat und können dort direkt auf die Donor-Antigene in Form einer alloreaktiven Effektor-T-Zelle reagieren (Lalor and Adams, 2000).

Konsequenterweise führt die Depletion der im Transplantat enthaltenen Donor-APCs, z.B. durch Antikörper, zu einer verzögerten Transplantatabstoßung (Benichou, 1999). Die indirekte Antigenpräsentation findet über die Rezipienten-APCs statt (Sayegh and Carpenter, 1996). Dazu werden die Fremdproteine des Spenderorgans durch einwandernde DCs und APCs des Rezipienten phagozytiert, prozessiert und anschließend in Verbindung mit den benötigten kostimulatorischen Molekülen auf der Zelloberfläche präsentiert. Das „priming“ von naiven T-Lymphozyten findet wie bei der direkten Antigenpräsentation in den regionalen Lymphknoten statt (Gould and Auchincloss, 1999). In der frühen Phase der Abstoßung überwiegt der direkte Weg der Antigenpräsentation und führt zu starken Immunreaktionen. Bei der chronischen Rejektion ist der indirekte Weg dominant. Die Immunantwort ist dabei schwächer ausgeprägt als bei der direkten Antigenpräsentation. Grundlage dafür ist das Absterben der „passenger“-Leukozyten in sämtlichen Organen mit Ausnahme der Leber (Cjete et al, 2001). Die hohe Frequenz alloreaktiver T-Lymphozyten in starken Abstoßungsmodellen wird der direkten Antigenpräsentation zugeschrieben, ebenso wie die direkte Zytotoxizität ausschließlich durch eine direkte Alloantigen-Erkennung hervorgerufen werden kann. Nichtsdestoweniger sind indirekt „geprimte“ T-Lymphozyten für die Aktivierung von Makrophagen verantwortlich, was zur Infiltration dieser Zellen in das Gewebe und zur Fibrosierung führt. Außerdem ist es wahrscheinlich, dass indirekt geprimte T-Lymphozyten eine Rolle bei der Entwicklung einer Alloantikörper-Antwort gegen das Transplantat spielen.

2.3.5 Migration von T-Lymphozyten

Die primären lymphatischen Organe sind der Hauptort der Lymphopoese. Bei Säugetieren reifen T-Lymphozyten im Thymus und die B-Lymphozyten in der fetalen Leber sowie im Knochenmark. Zu den sekundären lymphatischen Organen zählen die Lymphknoten, die Milz und Schleimhautstrukturen wie Tonsillen und Peyer-Plaques im Darm. Das Gewebe des sekundären lymphatischen Systems bildet die Umgebung, in welcher die Lymphozyten miteinander und mit den Antigenen reagieren, und es dient dazu, eine angelaufene Immunantwort in Gang zu halten. Nach der Reifung im Thymus verlassen die Lymphozyten diesen und zirkulieren zwischen den sekundären lymphatischen Organen, dem Gewebe und der Blutbahn. Als Austrittspforte aus der Blutbahn werden spezialisierte postkapilläre Venolen, die ein hohes Endothel besitzen (high endothelial venule, HEV) bevorzugt. Bei lokalen Entzündungen führt die Bildung der Zytokine IL-1, TNF- α und IFN- γ zu einer Aktivierung der umgebenen Endothelzellen mit verstärkter Expression der Adhäsionsmoleküle

P-Selektin, E-Selektin, ICAM und VCAM (Pober et al, 1996; Hammer et al, 2001). Außerdem werden Chemokine wie IL-8 oder MCP-1 gebildet und den Leukozyten über die Kopplung von Proteoglykanen präsentiert. Die auf der aktivierten Endotheloberfläche „entlangrollenden“ Lymphozyten erkennen die Chemokine, was wiederum zu der verstärkten Expression der Integrine LFA-1 und VLA-4 auf der Lymphozytenoberfläche führt (Briscoe et al, 1998). Die feste Bindung der Integrine an ihre Liganden ICAM und VCAM führt anschließend zu einer verstärkten Transmigration der Leukozyten ins Gewebe (Kirbey, 1996; Coito and Kupiec-Weglinski, 1996).

2.4 Toleranz

Als Toleranz wird das Ausbleiben einer Immunantwort gegen ein spezifisches Antigen bezeichnet, ohne dass die normale Immunkompetenz beeinflusst wird (Medawar et al, 1986). Die Toleranz gegen Selbst-Antigene ist eine essentielle Grundlage unseres Immunsystems, ohne die das Immunsystem das eigene Gewebe zerstören würde, wie es z.B. bei Autoimmunerkrankungen der Fall ist. Bei der Entstehung einer Transplantattoleranz haben die T-Lymphozyten eine Schlüsselfunktion, die auf ihre bedeutende Rolle bei den Rejektionsprozessen zurückzuführen ist. Es konnte bereits eine Toleranzinduktion in Nagern durch die Behandlung der Transplantatempfänger mit einem anti-CD4 mAk induziert werden (Lehmann et al, 1992). Dieser Ak ist gegen den CD4-Rezeptor gerichtet und modifiziert das TCR-vermittelte Signal 1. Die benötigte Dosis an Ak ist jedoch so hoch, dass eine Übertragung in das humane System kaum möglich ist, so dass alternative Wege zur Toleranzinduktion von großer Bedeutung sind. Es wird, in Abhängigkeit des Entstehungsortes, zwischen zentraler (Induktion im Thymus) und peripherer Toleranz (Induktion im peripheren lymphatischen System) unterschieden. Weiter können mindestens vier verschiedene Mechanismen bei der Toleranzentstehung unterschieden werden:

1) **Die zentrale Deletion von T-Zellen im Thymus.** Dieser als negative Selektion bezeichnete Prozess zeichnet sich durch die Deletion aller Thymozyten aus, die Autoantigene auf den Selbst-MHC-Komplex der APCs im Thymus erkennen. In Tiermodellen konnte gezeigt werden, dass nach Injektion von allogenen Peptiden oder Zellen in den Thymus des Transplantatempfängers eine Toleranz gegenüber dem Allo- Transplantat entsteht (Shimomura et al, 1995; Oluwole et al, 1997).

2) **Die periphere Deletion von T-Lymphozyten.** Diese kann einerseits durch Fas/FasL-Wechselwirkung verursacht werden, so dass es zur Apoptose von $CD4^+$ als auch $CD8^+$ T-Zellen kommt (Van Parijs and Abbas, 1998). Weiter spielt die vorhandene Antigenmenge, die mittels Peptid-MHC-Komplexes präsentiert wird, eine große Rolle. Hohe Antigenmengen sowie die Applikation von hohen Dosen an anti-CD3-Antikörpern fördern die Induktion der Apoptose (Witzke et al, 1998).

3) **Anergie:** Die Antigenerkennung von naiven T-Zellen in Abwesenheit von kostimulatorischen Molekülen induziert einen Zustand der „Nichtreaktivität“, auch als Anergie bezeichnet. Die Zellen können kein eigenes IL-2 produzieren, wodurch sie weder proliferieren noch zu Effektorzellen ausdifferenzieren können. Auch ein erneuter Antigenkontakt der anergen Zelle mit einer APC und dem erforderlichen kostimulatorischen Signal 2 führt nicht zu einer Aktivierung dieser Zelle. Dieser reaktionslose Zustand kann *in vitro* durch die Zugabe von hohen Konzentrationen IL-2 aufgehoben werden (Beverly et al 1992). Die Anergie spielt eine große Rolle bei der Aufrechterhaltung der Selbsttoleranz gegen Gewebsantigene, die nicht im Thymus während der negativen Selektion präsentiert wurden.

4) **Regulation/Suppression:** Das Vorhandensein von regulatorischen bzw. suppressiv wirkenden T-Zell-Populationen kann durch das Modell der „infektiösen Toleranz“ erklärt werden (Cobbold and Waldmann, 1998; Onodera et al, 1998). In diesem Modell kann die Abstoßung eines transplantierten Organs durch den adoptiven Transfer von T-Zellen, die aus einem toleranten Tier (α -CD4) gewonnen wurden, vollständig verhindert werden (Qin et al, 1993). Des weiteren konnte gezeigt werden, dass der Transfer von diesen regulatorisch wirkenden T-Zellen zu einer Umprogrammierung der naiven alloreaktiven T-Zellen zu regulatorischen Zellen im Rezipienten führt. Allerdings gelang der Versuch nur in einem schwachen Abstoßungsmodell. Mit Hilfe eines nicht-depletierenden anti-CD4 mAk gelang es, dieses auch in einem starken Transplantat-Rejektionsmodell der Ratte zu zeigen (Onodera et al, 1996).

Es konnte gezeigt werden, dass eine lang anhaltende Stimulation mit IL-10 *in vitro* zu der Generierung von regulativen T-Zellen führt. Diese Zellen besitzen das Potential, durch die Inhibierung der Proliferation von $CD4^+$ T-Lymphozyten, die Entstehung einer akuten Schleimhautentzündung des Dickdarms (Kolitis) zu verhindern (Groux et al, 1996; Groux et al, 1997). Verstärkte Bemühungen gehen in die Richtung, regulatorische oder suppressive

Zellen *in vivo* durch die Applikation von immunmodulatorischen Substanzen zu erzeugen. Dafür werden vor allem Moleküle eingesetzt, die die T-Zell Aktivierungssignale 1 und/oder 2 hemmen z.B. monoklonale nicht-depletierende Antikörper gegen CD4, CD8 oder CTLA-4Ig. Bis heute konnte keine exakte Charakterisierung und Phänotypisierung der regulatorischen Zellen erreicht werden. Hilfreiche Oberflächenmarker zur Unterscheidung zwischen funktionellen Gruppen der CD4⁺ T-Lymphozyten sind CD25 (α-Kette des IL-2 Rezeptors) und CD45RB (Maus), CD45RO (Human) bzw. CD45RC (Ratte). CD45RB ist die niedermolekulare Isoform von CD45, die auf Gedächtnis-T-Zellen exprimiert ist. Es konnte gezeigt werden, dass der Transfer von CD25⁺ depletierten Milzzellen in Nacktmäuse zur Entwicklung einer organspezifischen Autoimmunerkrankung führt, wohingegen der Kotransfer von CD25⁺ Zellen dieses verhindert (Annacker et al, 2001). Zahlreiche Versuche konnten bestätigen, dass eine CD4⁺CD25⁺ T-Zell-Population existiert, die regulatorische und auch suppressive Eigenschaften besitzt (Sawitzki et al, 2001). So verhindert der adoptive Transfer von *ex vivo* kultivierten CD4⁺CD25⁺ T-Zellen eine Immunreaktion, ausgelöst von den Immunzellen des Spenderorgans (graft-versus-host disease, GVHD) (Taylor et al, 2002). Es ist aber bislang weder geklärt, wie der exakte Mechanismus dieser Zellen aufgebaut ist, noch ob diese Zellen im Thymus oder in der Peripherie gebildet werden. Der Thymus scheint jedoch eine wichtige Funktion bei der Entstehung von Toleranz zu besitzen. So kommt es zu keiner Entstehung von regulatorischen Zellen in thymektomierten Tieren während einer anti CD4-Therapie (Kazuhiko et al, 1998). Neuere Untersuchungen zeigen, dass der Funktionsmechanismus der CD4⁺CD25⁺ Zellen nicht antigen-spezifisch ist (Thornton and Shevach, 2000). Eine direkte Suppression der CD8⁺ durch CD4⁺CD25⁺ T-Zellen konnte *in vitro* gezeigt werden. Sowohl die Proliferation als auch die IFN-γ Produktion der CD8⁺ Zellen wurde in Abwesenheit von APCs inhibiert, als Wirkungsmechanismus werden Zell-Zell-Kontakte diskutiert (Piccirillo et al, 2001). In den letzten Jahren wurde außerdem eine CD4⁺CD25⁻ T-Zell Population identifiziert, die in die Toleranzinduktion bei Transplantationen involviert ist und immunregulatorische Eigenschaften besitzt (Graca et al, 2002). Es konnte gezeigt werden, dass diese Zellpopulation bei der Unterdrückung einer entzündlichen Darmerkrankung (IBD) (Annacker et al, 2000) und beim Schutz gegen den autoimmun vermittelten Diabetes eine Rolle spielt (Stephens and Mason, 2000). Ein eindeutiger Zusammenhang zwischen Zytokinexpression und der Entstehung von regulatorischen T-Zellen konnte bis heute noch nicht nachgewiesen werden (Baecher-Allan et al, 2001). Die

Applikation von neutralisierenden Antikörpern gegen IL-4, IL-10 oder TGF- β führt nicht zur Verminderung der durch CD4⁺CD25⁺ T-Zellen vermittelten Suppression. Weiter zeigen auch die CD25⁺ T-Zell-Populationen von IL-4^{-/-} und IL-10^{-/-} „knock-out“-Mäusen kompetente suppressive Eigenschaften *in vitro* (Thornton et al, 1998). Andere Untersuchungen in Haut-Transplantationsmodellen zeigen, dass die Blockade von IL-10 und CTLA-4 zu einer Verminderung der immunregulatorischen Eigenschaften von CD4⁺CD25⁺ T-Zellen führt (Kingsley et al, 2002). Dies deutet auf einen direkten Zusammenhang zwischen IL-10 und CTLA-4 Expression und regulativen Potential von CD4⁺CD25⁺ Zell-Populationen hin. Die Vielzahl der Untersuchungen und Ergebnisse machen deutlich, wie komplex die Immunregulation aufgebaut ist, und dass viele Regulationsmechanismen und alternative Wirkungswege noch nicht aufgeklärt sind. IL-10 und zelloberflächen-gebundenes TGF- β werden als wichtige Zytokine im Zusammenhang mit suppressiv und regulatorisch wirkenden T-Zellen diskutiert (Nakamura et al, 2001). Regulatorische CD4⁺ T-Zellen scheinen in vielen Modellen eine wesentliche Rolle für den Erhalt und möglicherweise auch für die Induktion der Toleranz zu spielen.

2.5 Gentherapeutische Ansätze in der Transplantation

Gentherapeutische Ansätze sind definiert als das gezielte Einbringen von DNA-Molekülen in eine Zielzelle und die anschließende Expression des Proteins. Die gentherapeutischen Strategien zur Verlängerung der Transplantatüberlebenszeit umfassen den Transfer von immunsuppressiven, immunmodulatorischen und Transplantat-protectiven Molekülen. Welche Methode für den Gentransfer eingesetzt wird, hängt von zwei wichtigen Parametern ab: Zum einen von dem Expressionsort des Transgens (intrazelluläre und membranständige Moleküle verlangen einen effizienteren Gentransfer als sezernierte Proteine) und zum anderen von der Zielzelle (ruhende / proliferierende Zelle oder Expression des viralen Rezeptors auf der Zielzelle). Weitere wichtige Aspekte sind die Expressionshöhe und Regulierbarkeit des Transgens (Wood and Prior, 2001). Der Einsatz von gentherapeutischen Methoden in der Transplantation bietet ein enormes experimentelles und therapeutisches Potential. Vor allen die Möglichkeit der lokalen Expression von immunsuppressiven Molekülen könnte zu einer effizienten, örtlich begrenzten Immunmodulation führen, wobei systemische Effekte weitgehend reduziert werden. Aber auch systemische Anwendungen können bei einigen Erkrankungen zu Erfolgen führen. So konnte in einem Tiermodell des humanen Typ I

Diabetes die Entstehung des autoimmun vermittelten Diabetes durch die intramuskuläre Applikation von IL-10 exprimierenden Adenoviren verhindert werden (Goudy et al, 2001). Weiter besteht die Möglichkeit des *ex vivo* Gentransfers in das Organ des Spenders oder in Zellen des Immunsystems. Auf Grund dieser Kriterien steht nicht nur eine Vielzahl unterschiedlicher Expressionssysteme, sondern auch eine breitgefächerte Auswahl an potentiell therapeutischen Molekülen zur Verfügung. Die verschiedenen Ansatzmöglichkeiten innerhalb der gentherapeutischen Applikation lassen sich untergliedern in:

A) Genexpression im Transplantat. Bei diesem gentherapeutischen Ansatz werden Zellen des Transplantates *ex vivo* transduziert und anschließend wird das Organ transplantiert. Vor allem der adenovirale und retrovirale Gentransfer wird bei diesem System genutzt, um verschiedenste therapeutische Moleküle in den Spenderzellen zu exprimieren. Der Vorteil liegt bei der anschließenden lokalen Expression der exprimierten Moleküle. Aber gerade der adenovirale Gentransfer zeichnet sich durch eine transiente Genexpression aus, so dass die Expression und die damit verbundene protektive Wirkung des therapeutischen Gens zeitlich begrenzt ist. Alternativen dazu bietet der retrovirale Gentransfer, der sich durch eine stabile, langanhaltende Genexpression auszeichnet. Ein weiterer wichtiger Aspekt bei diesen Modellen ist der Umstand, dass die allogene Immunantwort nicht ausschließlich im transplantierten Organ, sondern auch in den sekundären lymphatischen Organen initiiert wird. Eine lokale Genexpression ausschließlich im Transplantat nimmt nur geringen Einfluss auf die immunologische Aktivierung der T-Zellen in den regionalen Lymphknoten, so dass es trotzdem zu einer Rejektion des Organs kommen kann.

B) Genexpression in Zellen des Immunsystems. Die meisten Zellen des Immunsystems zeichnen sich durch ihre hohe Beweglichkeit innerhalb des lymphatischen und nicht-lymphatischen Systems aus. Des weiteren besitzen diese Zellen ein spezifisches Migrationsverhalten in Abhängigkeit der immunologischen Umgebung und Antigenpräsentation (Hammer et al, 2002). Der Gentransfer in bestimmte Zellen des Immunsystems (T-Lymphozyten, Dendritische Zellen, Vorläufer Knochenmark-Zellen) ermöglicht dadurch die lokale Expression von immunmodulatorischen und inhibitorischen Molekülen, die ein „Microenvironment“ ausbilden können, welches einen direkten Einfluss auf die Zellen oder Moleküle hat, die in der Transplantat-Erkennung und Destruktion involviert sind. Da sowohl die T-Zellen als auch die Dendritischen Zellen initial an der allogenen Immunantwort beteiligt sind, stellt die Überexpression von therapeutischen

Molekülen eine sehr gute Möglichkeit dar, lokal und vor allem an einem sehr frühen Zeitpunkt die allogenen Immunantwort zu modulieren. Der Gentransfer in Zellen des Immunsystems ist zur Zeit am effektivsten mittels retroviralem Gentransfer zu verwirklichen. In den letzten Jahren hat der Einsatz von Immunzellen als therapeutisches Transportvehikel immer mehr an Bedeutung gewonnen (Kirk et al, 2000; Bollard et al, 2001; Takayama et al, 2001).

Des Weiteren stehen, bedingt durch die Komplexibilität des Immunsystems, eine große Auswahl an möglichen immunmodulatorischen und protektiven Molekülen für gentherapeutische Ansätze zur Verfügung.

A) Die Blockade der kostimulatorischen Signale. Hauptansatzpunkt ist die Blockade der B7/CD28 und CD40L/CD40 Interaktionen mittels CTLA4Ig und anti-CD40L (Knechtle et al, 1999; Najafian et al, 2000; Yamada et al, 2001; Laskowski et al, 2002). Es konnte in verschiedenen Transplantationsmodellen gezeigt werden, dass die Blockade von kostimulatorischen Signalen zu einer Verlängerung der Transplantatüberlebenszeit führt, aber nicht zu einer permanenten Akzeptanz bzw. Toleranz (Guillot et al, 2002). Die größten Erfolge wurden in Transplantationsmodellen mit nicht-humanen Primaten erzielt (Kirk et al, 1999). Die Applikation der Ak oder Immunglobuline ist systemisch und kann zu Komplikationen, wie z.B. der Bildung von Thrombosen führen. Der Gentransfer von CTLA4Ig ist assoziiert mit einer nicht-spezifischen Inhibierung einiger, aber nicht aller Immunzellen. Interessanterweise führt die adenovirale CTLA4Ig Transduktion von Spender-DCs nach adoptiven Transfer in den Rezipienten zu einer stark verlängerten Transplantatakzeptanz (Lu et al, 1999; Takayama et al, 2000).

B) Expression von anti-inflammatorischen Molekülen und Immundelevation. Bei diesen Ansätzen soll durch die Überexpression von Th2 Zytokinen (IL-4) oder anti-inflammatorischen Zytokinen (TGF- β , IL-10, vIL-10) die Th1 Zytokinexpression und zusätzlich partiell die Funktionen von APCs und Makrophagen inhibiert werden. In Abhängigkeit der verwendeten Modelle führt die Überexpression von IL-4 zur Verlängerung der Transplantatakzeptanz oder zeigt keinen immunmodulatorischen Einfluss (Ritter et al, 1999; Ke et al, 2000; Kato et al, 2000; Pleyer et al, 2000). In vielen unterschiedlichen Modellen konnte nach Überexpression von IL-10 oder vIL-10 eine Verlängerung der Transplantatüberlebenszeit und Inhibierung der Th1 Immunantwort

gezeigt werden (Qin et al, 1996; Qin et al, 1997). So verhindert der adenovirale Gentransfer von IL-10 oder vIL-10 die Entstehung eines autoimmun vermittelten Diabetes in einem Nacktmaus-Modell (Yang et al, 2002). Eine verlängerte Transplantatakzeptanz nach IL-10 Gentransfer konnte im Leber- und im Herz-Transplantationsmodell nachgewiesen werden (David et al, 2000; Tashiro et al, 2000). Die adenovirale Überexpression von TGF- β inhibiert im Herz-Transplantationsmodell die Th1 Immunantwort (Chan et al, 2000).

- C) Expression von Spender-MHC-Antigen.** Durch den Gentransfer von Spender-MHC-Genen in die Knochenmarkzellen des Empfängers kommt es zur Verlängerung der Transplantatakzeptanz (Sachs et al, 1993; Emery et al, 1997; Geissler et al, 2000).
- D) Expression von Molekülen, die zur Apoptose von Immunzellen führt.** Die Expression von FasL auf den Endothelzellen des Transplantates soll zu einer Induktion von Apoptose der alloreaktiven T-Zellen führen, die Fas exprimieren (Bellgrau et al, 1995; Ke et al, 2000). Dieses Modell hat seinen Ursprung in der Funktion von immunprivilegierten Organen (z.B. Auge, Hoden), bei denen die Expression von FasL auf verschiedenen Zelltypen eine wichtige anti-inflammatorische Rolle spielt (Greil et al, 1998). Unterschiedliche Resultate wurden beobachtet in Bezug auf die Überlebenszeit des Transplantates, in Abhängigkeit der viralen Vektors und des Modells.
- E) Expression von anti-apoptotischen und zytoprotektiven Genen in Zellen des Transplantates.** Die *in vitro* Expression von anti-apoptotischen Molekülen, wie Bcl-2, Bag-1, Bcl-xL und A20 in Endothelzellen führt nicht nur zum Schutz vor Apoptose, sondern inhibiert ebenso ihre Aktivierung (Zytokinsynthese) durch NF- κ B abhängige Mechanismen (Badrichani and Ferran, 2001; Contreras et al, 2001; Sawitzki et al, 2002). Auch die Inhibierung von Enzymen, die in der Aktivierung des Zellzyklus beteiligt sind, bieten einen Ansatz für die Toleranz-Induktion.

Trotz der großen Fortschritte in der Gentherapie ist noch kein gentherapeutisches Modell entwickelt worden, das zu einer Toleranzinduktion führt. Der Grund dafür liegt in den noch nicht vollständig aufgeklärten zellulären Prozessen, die in die allogene Rejektion involviert sind und in der noch nicht ausgereiften Entwicklung viraler Expressionssysteme. Die größten Bemühungen zielen derzeit auf die Entwicklung niedrig-immunogener Expressionssysteme mit der Möglichkeit einer stabilen Integration des therapeutischen Moleküls in das Wirtsgenom.

Des weiteren spielen das exakte „targeting“, die Regulierbarkeit und die gewebespezifische Expression des therapeutischen Gens eine große Rolle.

2.5.1 Virale Expressionssysteme in der Gentherapie

In Abhängigkeit von der Applikation werden unterschiedliche Ansprüche an virale und nicht-virale Expressionssysteme gestellt. Allen gemeinsam ist jedoch der Transfer einer angemessenen Menge des therapeutischen Gens, eine möglichst geringe Immunogenität und Toxizität des viralen Vektors und eine höchst mögliche Biosicherheit der verwendeten Modelle. Nicht-virale Transduktionssysteme zeichnen sich durch eine hohe Biosicherheit aus (Nishikawa et al, 2001). Die Transfektion von primären Zellen (T-Zellen, DC, hämatopoetische Vorläuferzellen) ist jedoch bislang noch sehr ineffizient. Viren dagegen sind biologische Systeme, die ihre Gene effizient in die Wirtszellen einschleusen. Dieses wird bei der Entwicklung von viralen Vektor-Systemen ausgenutzt. Der adenovirale Gentransfer zeichnet sich durch ein großes Wirtsspektrum, einen hohen Titer und meist sehr gute Transduktionseffizienzen aus. Der Nachteil liegt klar bei der starken Immunogenität und der transienten Expression des Transgens, da das Virus episomal in der Zelle vorliegt (Ritter et al, 2002). Adeno-assoziierte Viren (AAV) sind weniger immunogen, haben aber nur eine sehr begrenzte Verpackungskapazität. Retroviren dagegen lassen sich bislang nur mit geringen Titern herstellen, weisen aber den Vorteil auf, dass sie stabil in das Wirtsgenom integrieren und mittels Lentiviren sogar ruhende Zellen transduziert werden können (Naldini, 1998). Die Integration von Retroviren in das Wirtsgenom erfolgt über die LTR-Integrationssequenzen, die gleichzeitig als Promoter für das Transgen fungieren (Naviaux and Verma, 1992). Die Entstehung von Onkogenen durch die Transduktion in das Wirtsgenom stellt das größte Risiko dar.

virale Vektoren	Expression	Virusart	Verpackungs- kapazität	Infektion von ruhenden Zellen	Titer	Immunogenität
Adenovirus	transient	DNA	< 8 kb	ja	hoch	hoch
(AAV) Adeno- assoziierte Viren	stabil	DNA	4,1-4,9 kb	ja	hoch	gering
Herpes Simplex Virus	transient	DNA	< 50 kb	ja	hoch	hoch
Epstein-Barr Virus	stabil extrachromo- somal	DNA	<150 kb	ja		gering
Retroviren	stabil	RNA	< 10 kb	nein	gering	gering
Lentiviren	stabil	RNA	< 10 kb	ja	gering	gering

Tabelle1: Virale Expressionssysteme

2.5.2 Verpackungszelllinien für Retroviren

Alle bisherigen Untersuchungen zur genetischen Manipulation von primären T-Zellen zeigen deutlich, dass die Transduktion mittels Retroviren die bislang effektivste Methode darstellt therapeutische Moleküle stabil in T-Zellen zu exprimieren. Um die Biosicherheit dieses Transduktionssystems zu gewährleisten, wurden retrovirale Verpackungszelllinien entwickelt. Retroviren gehören zu den RNA-Viren, die über ein DNA-Intermediat (Provirus), welches sich stabil in das Genom der Zielzelle integriert, replizieren. Das Genom replikationskompetenter und infektiöser Retroviren besteht aus zwei identischen einzelsträngigen RNA-Molekülen mit einer Länge von 7 - 8 Kb (Levy, 1992). Rekombinante Retroviren für gentherapeutische Applikationen wurden in erster Linie auf der Basis muriner Retroviren, vor allem des Moloney Murine Leukemia Virus (MoMuLV), entwickelt. Mit Hilfe der Pseudotypisierung ist es möglich Retroviren mit unterschiedlichen Wirtsspektrum zu generieren. Die murinen Retroviren werden in Abhängigkeit ihres Wirtsspektrums als ekotroph oder amphotroph bezeichnet. Der Wirtsbereich ekotropher muriner Retroviren ist eingegrenzt auf Zellen von Mäusen und Ratten. Amphotrophe murine Retroviren besitzen einen breiteren Wirtsbereich, der sowohl murine als auch nicht-murine Zellen einschließt.

Zunehmend werden bei der Entwicklung rekombinanter Retroviren die Hüllproteine der murinen Retroviren modifiziert oder ausgetauscht. Dadurch wird ein breiterer Wirtsbereich, ein auf einen bestimmten Zelltyp ausgerichteten Wirtstropismus oder eine höhere Stabilität des Virions erreicht. Hierbei gewinnt unter anderen das Gibbon Ape Leukämie Virus (GaLV) als Spender des env-Proteins vermehrt an Bedeutung (Miller et al, 1991). GaLV weist einen gegenüber amphotrophen murinen Retroviren anderen Wirtsbereich auf, da es in der Lage ist, z.B. auch Rinder- und Hamsterzellen, hingegen keine Mäusezellen, effizient zu infizieren. GaLV weist auch eine bessere Transduktionsrate besonders für humane Zellen auf. Das G-Glykoprotein (VSV-G) des Vesicular Stomatitis Virus (VSV) kann verwendet werden, um murine Retroviren mit einem breiteren Wirtsbereich auszustatten, der zusätzlich die Infektion von Hamster- und Fischzellen ermöglicht (Burns et al, 1993). Darüber hinaus weisen VSV-G-Pseudotypetroviren eine höhere Partikelstabilität auf, die eine Konzentrierung der infektiösen Viruspartikel durch Ultrazentrifugation erlaubt. Ein spezifischer Zelltropismus kann erreicht werden, indem ein Ligand für ein zelluläres Oberflächenprotein, wie z.B. die Erkennungsdomäne eines Antikörpers, in das Hüllprotein muriner Retroviren inseriert wird (Russel et al, 1993).

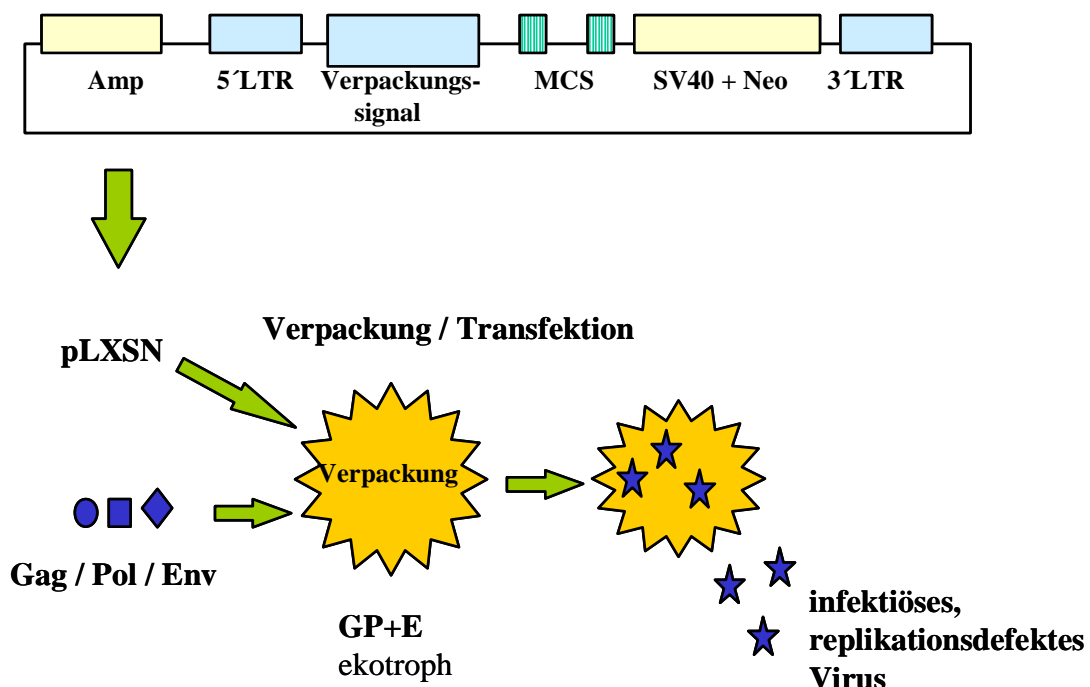


Abbildung 2: Herstellung rekombinanter replikationsdefekter Retroviren. Transfektion des retroviralen Vektors (LTR: „long terminal repeat“, Integrationsstelle des retroviralen Plasmides in die DNA der Zielzelle mit intrinsischer Promoteraktivität; MCS: „multiple-

cloning-site“; SV40: Polyadenylierungssignal; Amp, Neo: Resistenzgen) mit dem zu übertragenden Gen in die Verpackungszelllinie. Diese exprimiert die retroviralen Strukturgene konstitutiv, so dass von dem retroviralen Vektor Transkripte hergestellt werden, die sowohl translatiert als auch als genomische RNA mit Hilfe der viralen Strukturproteine zu neuen Virionen verpackt werden (gag, env, pol: retrovirale Proteine zur Bildung der Hülle, Strukturmatrix und Enzyme des Retrovirus).

2.5.3 T-Zellen als Vektoren in der Gentherapie

In dem Kapitel 2.4 wurde die Bedeutung von regulatorischen T-Zellen für die Erhaltung bzw. Induktion einer Toleranz dargestellt. Eine *in vitro* Generierung dieser T-Zellen wäre daher von enormer Bedeutung. Bislang ist es jedoch noch nicht gelungen, *in vivo* generierte regulatorische Zellen längere Zeit in Kultur zu halten oder sogar zu vermehren. Die Wachstums- und Überlebensfaktoren, die zur Kultivierung von regulatorischen T-Zellen benötigt werden, sind noch nicht genau bekannt. Untersuchungen in den letzten Jahren zeigen, dass regulatorische Zellen durchaus keine homogene Population darstellen, sondern dass unterschiedliche „Subsets“ mit verschiedenen Eigenschaften vorhanden sind (Roncarolo and Levings, 2000). Es erscheint daher ein sinnvoller Ansatz, regulatorische Zellen durch die gezielte Überexpression von regulatorischen und anti-inflammatorischen Molekülen *in vitro* zu generieren und *in vivo* mittels adoptiven Transfer einzusetzen. Von allen bekannten Gentransfer-Systemen hat sich in den letzten Jahren der retrovirale Transfer als besonders geeignet herausgestellt, T-Zellen zu transduzieren. Es wurde gezeigt, dass retroviral transduzierte T-Zellen in der Lage sind, stabil und dauerhaft ein Protein zu exprimieren (Blaese et al, 1995). Außerdem exprimieren aktivierte T-Zellen vermehrt ihr Transgen (Quinn et al, 1998; Hammer et al, 2000). Mittels einer viralen Transduktion mit gleichzeitiger allogener Stimulation, kann *in vitro* eine Zell-Population generiert werden, die nicht nur transgen für ein Reportergen (EGFP) ist, sondern auch alloantigen-spezifische Eigenschaften aufweist. Über weitere Restimulationen und Selektionsschritte können T-Zelllinien generiert werden, die einen einheitlichen Phänotyp besitzen und ihr Transgen EGFP stabil exprimieren (Flügel et al, 1999). Weiter migrieren alloantigen-spezifische T-Lymphozyten nach adoptiven Transfer spezifisch zu den entscheidenden Orten der Antigenpräsentation (Transplantat, Lymphknoten, Milz) und exprimieren allo-spezifisch ihr Reportergen EGFP (Flügel et al, 2001; Hammer et al, 2002). Dies ist eine wichtige Voraussetzung dafür, wenn immunregulatorische Proteine (z.B. IL-10, vIL-10, TGF- β) nach retroviralem Gentransfer zur

Verhinderung der Transplantatrejektion exprimiert werden sollen. Die T-Zell-aktivierungsabhängige Hochregulation des Transgens konnte durch Blockierung des Signals 1 und Signal 2 inhibiert werden (Hammer et al, 2000). Außerdem weisen diese retroviral transduzierten T-Zellen den gleichen Phänotyp ($CD25^+$, $CD45RC^{low}$) wie die bereits beschriebenen Toleranz-induzierenden T-Zellen auf (Hammer et al, 2002). Ein weiteres wichtiges Argument ist die lange Lebensdauer der T-Zellen und die unkomplizierte Isolierung und Kultivierung der Zellen *in vitro*. Die aufgeführten Argumente machen deutlich, welch enormes Potential T-Zellen besitzen, wenn sie als Transportvehikel für therapeutische Gene eingesetzt werden. Eine systemische Applikation ist möglich, die Expression des Transgens erfolgt jedoch alloantigen-spezifisch und wird über die Aktivierung der T-Zellen noch verstärkt.

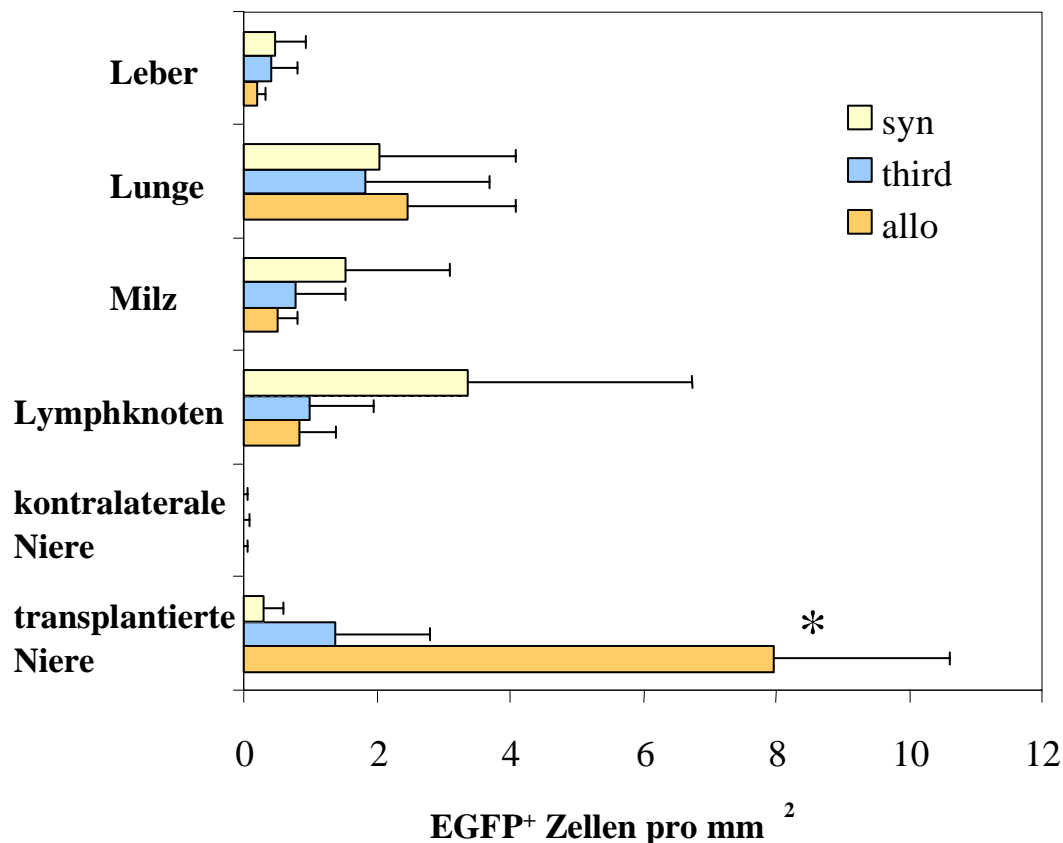


Abbildung 3: Migration EGFP transgener und alloantigen-spezifischer T-Zellen nach adoptiven Transfer im Nierentransplantationsmodell (Hammer et al, 2002, J. Am. Soc. Nephrol.).

2.6 Virales Interleukin-10 als immunmodulatorisches Molekül

Das vom Epstein-Barr Virus abstammende Interleukin-10 (IL-10) Homolog virales IL-10 (vIL-10) hat in den letzten Jahren im Mittelpunkt vieler Forschungsprojekte gestanden. Es zählt zu den anti-inflammatorischen Zytokinen und weist eine ca. 90%ige Homologie zum humanen IL-10 (hu IL-10) auf (Moore et al, 2001). IL-10 wird vor allem von Monozyten/Makrophagen und T-Zellen gebildet. Es weist ein breites Spektrum von anti-inflammatorischen Eigenschaften auf. Es wurde gezeigt, dass IL-10 die Expression von MHC II Molekülen und kostimulatorischen Molekülen auf Monozyten und dendritischen Zellen inhibiert (de Waal Malefyt et al, 1991b; Moore et al, 2001). Auch die Produktion inflammatorischer Zytokine wie IFN- γ , IL-1, IL-12, IL-18 und TNF- α wird durch IL-10 vermindert (Kawamoto et al, 2001). Ein weiterer wichtiger anti-inflammatorischer Effekt von IL-10 ist die Unterdrückung der Proliferation von allogen aktivierten Lymphozyten (de Waal Malefyt et al, 1991a; Qin et al, 1997). IL-10 hat neben den immunsuppressiven Effekten auch stimulatorische Effekte auf T- und B-Zellen. So wird z.B. die Expression von MHC-II-Molekülen auf B-Zellen erhöht und damit ihre Aktivierung unterstützt. Virales IL-10 besitzt trotz der hohen Sequenzhomologie zum zellulären IL-10 diese immunstimulatorischen Eigenschaften nicht. Das Ausbleiben einer Aktivierung der humoralen Immunantwort durch vIL-10 in Kombination mit seinen immuninhibitorischen Eigenschaften macht dieses Molekül zu einem interessanten Kandidaten für die Immunmodulation und ist als wirkungsvolleres Immunsuppressivum als cIL-10 anzusehen. In den letzten Jahren wurden weitere anti-inflammatorische Effekte, vermittelt durch vIL-10, entdeckt. So werden dendritische Zellen nicht nur in ihrer Reifung und Funktion inhibiert, sondern auch in ihrem Migrationsverhalten beeinflusst. Dieses wird über die Inhibierung des Chemokinrezeptors CCR7 vermittelt (Takayama et al, 2002). Eine verminderte MHC I Expression auf B-Zellen durch die Inhibierung von TAP 1 wird ebenso über vIL-10 vermittelt (Zeidler et al, 1997). TAP 1 ist die kleinere Untereinheit des dimeren Proteins TAP, welches auf die Translokation zytosolischer Proteine in das Lumen des Endoplasmatischen Retikulums spezialisiert ist (Neefjes et al, 1993). An einem Modell der Thrombose konnte gezeigt werden, dass die Expression von vIL-10 zur Inhibierung der Adhäsionsmoleküle P- und E-Selektin und ICAM führt (Henke et al, 2000). In einigen Transplantationsmodellen und im Zusammenhang mit der Generierung von regulatorischen Zellen wurde vIL-10 und auch IL-10 bereits untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass IL-10 *in vitro* regulatorische T-Zellen generieren kann (Groux et al, 1997). Eine

mehrfache *in vitro* Stimulation von humanen oder murinen CD4⁺ T-Lymphozyten in Gegenwart von IL-10 führt zu der Entstehung einer neuen T-Zell-Population. Diese zeichnet sich durch eine geringe Proliferations-Kapazität, eine hohe IL-10 und IFN- γ Produktion und geringe Expression von IL-2 bzw. keine IL-4 Expression aus. Dieses Zytokinprofil unterscheidet sich eindeutig von den in der Literatur beschriebenen Zytokinmustern der Th0, Th1 und Th2 Populationen. IL-10, wie auch TGF- β werden als Wachstumsfaktoren von regulatorischen T-Zellen beschrieben, scheinen aber nicht essentiell für ihre Entstehung zu sein. In verschiedenen allogenen Herztransplantations-Modellen führt die adenovirale oder retrovirale Überexpression von TGF- β und vIL-10 zur Verlängerung der Transplantatakzeptanz (Qin et al, 1995, 1996). Weiter konnte gezeigt werden, dass der virale Gentransfer von zellulärem IL-10 zur permanenten Akzeptanz im Lebertransplantationsmodell (Shinozaki et al, 1999) und zur Verlängerung der Transplantatüberlebenszeit im Herz-Transplantationsmodell der Ratte führt (David et al, 2000).

Auf Grund der bisherigen Ergebnisse wird deutlich, dass eine Kombination aus

- 1) einem geeigneten immunmodulatorischen und –inhibitorischen Molekül (vIL-10)
- 2) retroviraler Transduktion des Moleküls in T-Zellen
- 3) und gleichzeitiger allogener Stimulation der T-Zellen

eine neue Möglichkeit darstellt, regulativ wirkende T-Zellen zu generieren. Das spezifische Migrationsverhalten und die T-Zellaktivierungsabhängige Expression des Transgens untermauern noch das Potential dieser *in vitro* generierten T-Zellen.

3 Aufgaben- und Zielstellung

In vorangegangenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass retroviral modifizierte, alloantigen spezifische T-Lymphozyten ein geeignetes Transportsystem für therapeutische Moleküle darstellen. Diese Zellen zeichnen sich durch ein spezifisches Migrationverhalten und eine T-Zellaktivierungsabhängige Expressionssteigerung des Transgens nach alloantigen-spezifischer Stimulation aus.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung von alloantigen-spezifischen und für virales Interleukin-10 (vIL-10) transgene T-Lymphozyten (T_{vIL-10}-Lymphozyten) hinsichtlich ihres therapeutischen Potentials zur spezifischen Inhibierung und/oder Modulierung der Immunantwort *in vitro* und im allogenen Transplantationsmodell *in vivo*.

Im Mittelpunkt der vorliegenden Doktorarbeit standen die nachfolgend aufgeführten methodischen Etablierungen und Durchführungen verschiedener *in vitro* und *in vivo* Experimente.

- A) Konstruktion des retroviralen Vektors pLXSN-vIL-10
- B) Herstellung der retroviralen Verpackungszelllinie
- C) Generierung einer retroviral modifizierten alloantigen spezifischen T-Zelllinie
(T_{vIL-10}-Lymphozyten)
- D) Charakterisierung der T_{vIL-10}-Lymphozyten
- E) Funktionsanalysen der T_{vIL-10}-Lymphozyten mittels verschiedener *in vitro* Modelle
- F) Migrations- und Funktionsanalysen *in vivo* nach adoptivem Transfer der T_{vIL-10}-Lymphozyten im allogenen Herz-Transplantationsmodell
- G) Untersuchungen zum Transplantatüberleben nach adoptivem T_{vIL-10}-Lymphozyten Transfer

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Allgemeine technische Geräte

Autoklav	Gössner, Hamburg
Einweg-Pasteurpipetten	Greiner, Nürtingen
Eismaschine AF-10	Scotsman, Mailand, Italien
Feinpipetten	Eppendorf, Hamburg
Gefrierschränke	Bosch, Stuttgart
Glaswaren	Schott Mainz
Kühlschränke	Liebherr, Ochsenhausen
pH-Meter PH 62	wiss.-techn. Werkstätte, Weilheim
Pipettierhilfe	Tecnomara/Integra Biosciences, Fernwald
Schüttelinkubator Thermostat 5320	Eppendorf, Hamburg
Schüttler, Vortex MS2 Minishaker	IKA-Werke GmbH & Co KG, Staufen
Sterile Einwegpipetten (1, 2, 5, 10, 25ml)	Greiner, Nürtingen
Waagen	Sartorius, Göttingen
Wasserbad	GFL, Burgwedel

4.1.2 Geräte und Material für die Zellkultur

10ml Tube	Falcon, Oxnard, USA
50ml Tube	Falcon, Oxnard, USA
6-well Platten	Falcon, Oxnard, USA
96-well Flachbodenplatten	Nunc, Roskilde, Dänemark
96-well Rundbodenplatten	Nunc, Roskilde, Dänemark
Bestrahlungsanlage Gamma Cell 40	Atomic Energy, Mississauga, Canada
Cell Quest (Analysesoftware)	Becton Dickinson, San Jose, USA
Durchflußzytometer FACSort	Becton Dickinson, San Jose, USA
Einfrierröhrchen	Nunc, Roskilde, Dänemark
ELISA-reader Anthos 2001	Anthos Mikrosysteme GmbH, Köln
ELISA-software Anthos	Anthos Mikrosysteme GmbH, Köln
FACScan	Becton Dickinson, San Jose, USA
Inkubationsschränke	Jouan, Unteraching
Kulturflaschen (50ml, 250ml)	Falcon, Oxnard, USA
Laser Mikroskop	Zeiss, Jena
Lichtmikroskop	Leica, Braunschweig
Neubauer Zählkammer	Fein-Optik, Blankenburg
Sickstofftanks	Taylor-Wharton, Theodore, AL, USA
Sterilwerkbänke	Zapf, Sarstedt
Zellkulturschalen (6cm, 10cm)	Falcon, Oxnard, USA
Zellsiebe, 40 und 100µm Porengröße	Falcon, Oxnard, USA
Zentrifugen	
Biofuge Fresco	Heraeus, Hanau
Centrifuge 5402	Eppendorf, Hanau
Centrikon T-324	Kontron, Neufahrn

4.1.3 Geräte und Material für die Molekularbiologie und Biochemie

ABI PRISM 7700 Sequenz Detection System	Applied Biosystems, PE, Rodgau-Jügesheim
Agilent 2100 Bioanalyser	Agilent Technologies, Waldbronn
DNA Thermo Cycler (TC1)	Applied Biosystems, PE, Rodgau-Jügesheim
Elektrophoresekammer, horizontal & Zubehör	Renner GmbH, Dannstadt
Eppendor fzentrifuge 5402	Eppendorf, Hamburg

Gel-Imager & *E.A.S.Y. Enhanced Analysis System*
 GeneAmp PCR System 9600
 Heizblock
 Heizrührer
 Immulite
 Microwellengerät
 RNA/DNA Kalkulator GeneQuant II
 Spannungsgerät Consort 835
 Vakuum-Zentrifuge Concentrator 5301

Herolab, Wiesloch
 Applied Biosystems, PE, Rodgau-Jügesheim
 Kleinfeld-Labortechnik, Berlin
 Neolab, Heidelberg
 DPC Biermann GmbH, Bad Nauheim
 Bosch, Stuttgart
 Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
 AGS, Heidelberg
 Eppendorf, Hamburg

4.1.4 Chemikalien

Agar
 Agarose
 Ampecillin
 AmpliTaq DNA-Polymerase, Puffer + MgCl₂
 Aqua ad iniectabilia
 Asparagin
 Baktotrypon
 Brefeldin A
 Bromphenolblau
 ConcanvalinA (ConA)
 Diethyl-Pyrocabonate (DEPC)
 Dimethylsulfoxid (DMSO)
 DMEM
 DNA-marker, 1kb
 dNTPs
 Ethidiumbromid
 Ethyldiamin-Tetraessigsäure-Na-Salz (EDTA)
 FACSTM Permeabilizing Solution
 Fetales Kälberserum
 Ficoll-Paque Plus
 Geneticin (G-418 Sulfat)
 Glycerol
 Ionomycin
 Isopropanol
 L-Glutamin
 MMLV-RT
 MMLV-RT, Buffer-Set
 Natriumazid
 Natriumpyruvat
 Nicht-essentielle-Aminosäuren
 oligo DT
 Paraformaldehyd
 PBS
 Penicillin-Streptomycin
 Peressigsäure
 Pferdeserum (HS)
 Phorbol 12-myristate 13-acetat (PMA)
 Polybren
 Ratten-Ficoll
 Rekombinantes humanes Interleukin-2
 RNA-Marker
 Saponin
 Trypan Blue
 Trypsin-EDTA
 β-Mercaptoethanol

Gibco BRL, Gaithersburg, USA
 Gibco BRL, Gaithersburg, USA
 Merck, Darmstadt
 Applied Biosystems, PE, Rodgau-Jügesheim
 Delta Pharma, Pfullingen
 Sigma, München
 DIFCO, Detroit, USA
 Sigma, München
 Serva, Heidelberg
 Sigma, München
 Sigma, Steinheim
 Serva, Heidelberg
 Life Technologies, Karlsruhe
 Gibco BRL, Gaithersburg, USA
 Amersham Pharmacia, Uppsala, Schweden
 Carl Roth GmbH, Karlsruhe
 Sigma, Steinheim
 Becton Dickinson, San Jose, USA
 Seromed, Berlin
 AP-Biotech, Uppsala, Schweden
 Gibco BRL, Gaithersburg, USA
 Serva, Heidelberg
 Sigma, Steinheim
 Baker Analysed, Deventer
 Sigma, Steinheim
 Gibco BRL, Gaithersburg, USA
 Gibco BRL, Gaithersburg, USA
 Sigma, Steinheim
 Seromed, Berlin
 Gibco BRL, Gaithersburg, USA
 Amersham Pharmacia, Freiburg
 Sigma, Steinheim
 Life Technologies, Karlsruhe
 Gibco BRL, Gaithersburg, USA
 Life Technologies, Karlsruhe
 Böhringer, Mannheim
 Sigma, Steinheim
 Sigma, Steinheim
 Sigma, Steinheim
 Cetus Corporation, Emeryville, CA, USA
 Ambion, Huntingdon, UK
 Sigma, Steinheim
 Sigma, Steinheim
 Life Technologies, Karlsruhe
 Merck, Darmstadt

4.1.5 Versuchssysteme (Kits)

First Strand cDNA Synthese Kit
Gel-Extraktions-Kit Jetsorb
Human IL-10 ELISA
Milenia Ex vivo Stimulations Kit
Qiagen Plasmid Kit 2.0 Maxi
Qiagen Plasmid Kit 2.0 Mini
Rat IFN- γ ELISA
Rat IL-10 ELISA
Rat IL-2 ELISA
RNA 6000 Reagents & Supplies
StrataPrep Total RNA Miniprep Kit

Amersham Pharmacia, Uppsala, Schweden
Genomed, Bad Oeyenhausen
Immunotech, Marseille, France
Milenia Biotec GmbH, Bad Nauheim
Qiagen, Hilden
Qiagen, Hilden
Biosource, Camarillo, CA, USA
Biosource, Camarillo, CA, USA
Biosource, Camarillo, CA, USA
Agilent Technologies, Waldbronn
Stratagene, La Jolla, CA, USA

4.1.6 Enzyme

BamH I
Collagenase Typ V
DNase I Rnasefrei
DNA-T4-Ligase
EcoR I
EcoR V
Hpa I

New England Biolabs, Schwalbach
Sigma, München
Stratagene, Amsterdam, NL
Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
New England Biolabs, Schwalbach
New England Biolabs, Schwalbach
New England Biolabs, Schwalbach

4.1.7 Antikörper und Membranfarbstoffe

5-(and-6)-CFDA-SE
anti-rat CD4 mAb FITC
anti-rat CD8 mAb PE
anti-rat CD 25 mAb PE
anti-rat IFN- γ mAb PE
anti-rat L-Selectin mAb PE
anti-rat α, β TCR mAb PerCP
IgG1 Isotyp
PKH-26-GL
SNARF R-1

Molecular Probes, Leiden, Holland
Pharmingen, San Diego, CA, USA
Pharmingen, San Diego, CA, USA
Biosource, Camarillo, CA, USA
Biosource, Camarillo, CA, USA
Pharmingen, San Diego, CA, USA
Biosource, Camarillo, CA, USA
Pharmingen, San Diego, CA, USA
Sigma, München
Molecular Probes, Leiden, Holland

4.1.8 Anästhetika

Ketavet
Rompun

Pharmacia & Upjohn GmbH, Erlangen
Bayer Vital GmbH, Leverkusen

4.1.9 Zelllinien

GP+E 86 Verpackungszelllinie
GP+E EGFP Verpackungszelllinie
NIH 3T3, Maus-Fibroblasten

Dr. A. Flügel, MPI für Neurobiologie, Abt.
Neuroimmunologie, München
Dr. A. Flügel
DSMZ, Braunschweig

4.1.10 Rattenstämme

DA, Haplotyp: RT1^{avl}
Lewis, Haplotyp: RT1^l

Moellegard, Dänemark
Moellegard, Dänemark

4.1.11 Bakterienstämme

DH5 α

supE44, Δ *lacU169* (Φ 80*lacZ* Δ M15), *hsdR17*, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*,
thi-1, *relA1*

4.1.12 Expressionsvektoren

pLXSN	<i>Amp^R, Neo^R, pBR322ori, ψ^+, P_{SV40}, 5'/3'-LTR-Promoter</i>	Clontech
p123T	<i>Ap^R, lacI, lacZα, M13ori, ColE1ori, T3/T7-Promoter</i>	Mo Bi Tec
pBluescript-vIL10	<i>Amp^R, lacI, lacZα, F1(+)-ori, F1(-)-ori, ColE1ori, T3/T7-Promoter</i>	Dr. F. Cefire MPI, Berlin
pcDSR α -BCRF1-vIL-10	<i>SV40ori, RU5', Amp^R</i>	Dr. R. de Waal Malefyt, DNAX, CA, USA

4.1.13 Puffer und Medien

DMEM:	1 mM	Natriumpyruvat
	2 mM	L-Glutamin
	100 U/ml	Penicillin
	100 µg/ml	Streptomycin
	10 %	Fötales Kälberserum
	+/- 1 mg/ml	G-418
T-Zell-Medium (TCM):	1ml/100ml	nicht-essentielle Aminosäuren
	1 mM	Asparagin
	100 U/ml	Penicillin
	100 µg/ml	Streptomycin
	5 mM	β -Mercaptoethanol
	2 %	autologes Serum
	+/- 10 %	Pferdeserum (56°C hitze-inaktiviert)
	+/- 0,4 mg/ml	G-418
	in Glutamax-Medium	
2 x HBSP-Puffer:	50 mM	Hepes
	10 mM	KCl
	12 mM	Dextrose (Glucose)
	280 mM	NaCl
	1,5 mM	Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O
	pH 7,05	
FACS-Puffer:	2 %	FKC (56°C hitze-inaktiviert)
	0,1 %	NaN ₃
	in PBS	
TAE:	40 mM	Tris-Base
	20 mM	Essigsäure
	2 mM	EDTA (pH 8,0)
DNA-Marker:	50 µl	1kb-Marker
	100 µl	Ladepuffer
	350 µl	TAE-Puffer (1x)
Lösung D:	3,676 g	(tri)-Nacitrat-Dihydrat
	236,32 g	Guanidine-Isothiocyanate
	2,5 g	N-Lauroylsarcosin
	ad 500 ml DEPC-H ₂ O, pH 7,0	
DEPC-H ₂ O:	1 ml	Diethyl Pyrocarbonate
	ad 1000 ml Aqua dest.	

4.2 Methoden

4.2.1 Klonierung von vIL-10 in den retroviralen Expressionsvektor pLXSN

Als Ausgangsplasmide für die Klonierung wurden die Vektoren pLXSN und pBluescript-vIL-10 (pBS-vIL-10) eingesetzt. Alle Standardmethoden, wie Plasmidpräparationen, Restriktionsspaltungen, gelelektrophoretische Trennungen, u.s.w. wurden nach Sambrook et al (1989) bzw. dem jeweiligen Protokoll des Herstellers durchgeführt. Alle für diese Arbeit relevanten, modifizierten Methoden werden hier aufgeführt.

4.2.1.1 Auftrennung der DNA-Fragmente mittels Agarosegelelektrophorese

Nach dem Restriktionsverdau der Vektoren pLXSN mit BamH I und Hpa I (blunt-end-cutter) und pBS-vIL-10 mit BamH I und EcoR V (blunt-end-cutter) wurden die DNA-Fragmente je nach Größe in einem 0,8-1,5%igen Agarosegel aufgetrennt. Die Herstellung des Agarosegels erfolgte in 1 x TAE-Puffer. Die Agarose wurde in Laufpuffer durch Aufkochen gelöst und mit Ethidiumbromid (ca. 20µgEB/100ml) versetzt. Die an der Elektrophoreseapparatur angelegte Spannung betrug in der Regel 100V. Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurden die DNA-Fragmente mit UV-Licht anhand des fluoreszierenden, interkalierenden Ethidiumbromids detektiert. Mit Hilfe des *Gel Imager* Systems erfolgte die digitale Auswertung.

4.2.1.2 Isolierung von DNA aus Agarosegelen mit Glasmilch

Die Isolierung von DNA-Fragmenten wurde nach Anleitung des Jetsorb-Kits von *Genomed* durchgeführt. Die Eluation der DNA aus der Glasmilch erfolgte in 3x 7µl H₂O durch je 5 Minuten Inkubation bei 50°C. Die Konzentration der DNA wurde photometrisch oder durch Quantifizierung mit dem *Gel Imager* bestimmt.

4.2.1.3 Ligation von vIL-10 in den retroviralen pLXSN-Vektor

Zur Ligation wurde das vIL-10 DNA-Fragment und der pLXSN-Vektor eingesetzt. In einem 10 µl Ansatz wurden zu 50 ng Vektor 1 µl des zehnfach konzentrierten OPA-Puffers, 1 µl einer 10 µmolaren ATP Lösung und 1 µl T4-Ligase pipettiert. Das Insert wurde in einer Konzentration eingesetzt, in welcher das Verhältnis der Kopienzahlen von Vektor/Insert 1:1 betrug.

$\text{Konz. Insert} = \frac{\text{x bp PCR-Prod. x 50ng Vektor}}{\text{x bp Vektor Größe}}$
--

Der Ansatz wurde über Nacht bei 14°C inkubiert und anschließend zur Transformation eingesetzt.

4.2.1.4 Kulturmedien und Agarplatten für Bakterien

LB-Medium: 10g/l Bacto-Trypton, 5 g/l Bacto-Hefeextrakt, 10 g/l NaCl, autoklavieren.

Agarplatten: Dem LB-Medium wurden 15g Agar pro Liter zugegeben. Ampicillin-haltigen Agarplatten wurde 100µg/ml Ampicillin aus einer Stammlösung (100 mg/ml) beigemischt.

4.2.1.5 Transformation von *E. coli*

Die Herstellung und Lagerung der kompetenten Zellen erfolgte mit der Kalzium-Chlorid Methode nach Angaben des Maniatis. 150µl kompetenter *E. coli* DH5α Zellen wurden langsam auf Eis aufgetaut, mit 10 ng Vektor (10µl von dem Ligationsansatz) versetzt und für 30 min im Eisbad belassen. Der Ansatz wurde für exakt 45 Sekunden auf 42°C erhitzt und sofort auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 750µl LB-Medium wurden die Zellen 1h bei 37°C im Schüttler inkubiert. Anschließend wurden verschiedene Mengen des Transformationsansatzes auf antibiotikahaltigen Platten ausplattiert und über Nacht im Brutschrank bei 37°C kultiviert. Die Klone wurden durch die ‚Mini‘-Plasmidpräparation und anschließender Restriktion charakterisiert.

4.2.1.6 Konservieren von Bakterienkolonien

Zur kurzfristigen Lagerung wurden die Bakterien auf Agarplatten ausgestrichen, bei 37°C über Nacht inkubiert und im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt. Zur Langzeitlagerung wurden 5 ml einer Über-Nacht-Kultur mit Glycerol im Verhältnis 4:1 vermischt und zu 1ml Aliquots bei – 70°C gelagert.

4.2.1.7 DNA-Präparation

Zur Isolierung und Reinigung von Plasmid-DNA in kleinen Mengen wurde neben eines Kit-Systems der Firma *Qiagen* auch eine Vorschrift der alkalischen Schnellisolation nach 'Maniatis' angewandt.

Die Anzucht der Bakterien erfolgte in 3 ml LB-Medium mit einer Ampicillin-Endkonzentration von 100 µg/ml. Die Bakterienkultur wurde über Nacht bei 37°C im Schüttler bei 220 rpm inkubiert. Die Zellen wurden 10 min bei 1200 rpm, 4°C abzentrifugiert und das Pellet in 100 µl P1 resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µl P2 und vorsichtigem Mischen wurde die Zellsuspension zur Lyse der Zellen 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 150 µl P3 und Inkubation der Proben für 5 min auf Eis, um mit Hilfe der hohen Salzkonzentration denaturierte Proteine, chromosomale DNA und Zellreste zu präzipitieren. Nach 15 min Zentrifugation (14 000g, 4°C) wurde zu dem Überstand 0,7 Volumen Isopropanol hinzugegeben und die Plasmid-DNA während 15 min bei Raumtemperatur gefällt. Um das DNA-Pellet zu gewinnen, wurde wiederum 15 min, 14 000g, 4°C zentrifugiert, und anschließend einmal mit 400 µl 70%igen Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde 1-2 min in der Vakuumzentrifuge getrocknet und in 50 µl aqua dest. mit einer Endkonzentration von 100 µg/ml RNase aufgenommen.

- P1:** 25 mM Tris pH 8
10 mM EDTA
50 mM Glucose
ad 50 ml aqua dest
P2: 0,2 M NaOH
1% SDS
P3: 3 M Kaliumacetat, pH 5,5

Um größere DNA Mengen zu isolieren (bis zu 2 µg/µl), wurde der Maxi-Prep-Kit von *Qiagen* verwendet.

4.2.2 Herstellung der virusproduzierende Verpackungszelllinie GP+E vIL-10

Das retrovirale Gentransfersystem umfasst mindestens zwei Komponenten, die Verpackungszelllinie und den retroviralen Vektor (siehe Abb.2 in der Einleitung). Der retrovirale Vektor ist dahingehend modifiziert, dass die retroviralen Strukturgene gag, env und pol deletiert sind. Er verfügt mindestens über das Verpackungssignal Ψ und die retroviralen 5'- und 3'-LTRs, die eine Insertionsstelle für das zu übertragende Gen sowie ggf. einen Selektionsmarker flankieren. Die Verpackungszelllinie stellt die retroviralen Proteine gag, env

und pol (Helfergenom) zur Verfügung, die für die Verpackung der Vektor-RNA und somit für die Erzeugung retroviraler Partikel notwendig sind. Die Verpackungszelllinie wird hergestellt, indem das Helfergenom in eine Zelllinie eingeführt wird. Das Verpackungssignal Ψ ist bei diesem Helfergenom deletiert, so dass virale RNA, die in der Verpackungszelllinie von dem Helfergenom abgelesen wird, nicht in Virionen verpackt wird. Nach Transfektion der Verpackungszelllinie mit dem retroviralen Vektor werden von diesem Transkripte hergestellt, die sowohl translatiert als auch als genomische RNA in neue Virionen verpackt werden, welche von der Verpackungszelllinie abgegeben werden. Mit Hilfe dieser Virionen, die replikationsdefekt sind (gag-, env-, pol-RNA fehlt), können Zielzellen infiziert werden, in deren Genom sich das von der übertragenen retroviralen RNA umgeschriebene Provirus stabil integriert. Voraussetzung dafür ist, dass sich die Zielzellen in der mitotischen Zellteilungsphase befinden, da ausschließlich zu diesem Zeitpunkt die Kernmembran aufgelöst ist und somit die Virus-DNA in das Wirtsgenom integrieren kann. In den transduzierten Zellen werden das zu übertragende Gen als auch der Selektionsmarker exprimiert. Das auf dem pLXSN vorhandene Resistenzgen Neomycin ermöglicht zum einen die Selektionierung von transfizierten Zellen der Verpackungszelllinie und zum anderen eine Selektionierung der erfolgreich transduzierten T-Lymphozyten mittels des synthetischen Neomycin Analogs G 418.

Die von NIH/3T3 Zellen abgeleitete Verpackungszelllinie GP+E 86 (Dr. Flügel, MPI für Neurobiologie, Abt. Neuroimmunologie, München) wurde in T75 Kulturflaschen in DMEM, 10% FKS, Penicillin, Streptomycin, Glutamin bei 5% CO₂ im Inkubator inkubiert. Die Zellen wurden mit ca. 90% Konfluenz je nach Bedarf im Verhältnis 1:3 bis 1:10 aufgeteilt.

4.2.2.1 Kalzium-Phosphat Transfektion

Einen Tag vor der Transfektion wurden 1×10^6 GP+E 86 Zellen je 6cm Schale ausplattiert, so dass sie am nächsten Tag 60-70% konfluent gewachsen waren. Zwei bis vier Stunden vor der Transfektion wurde das Medium gegen 4,5ml frisches Medium ausgetauscht. Anschließend wurde das Präzipitat, bestehend aus 10µg DNA, 31µl 2M CaCl₂, ad 250µl a. dest. und 250µl 2xHBSP-Puffer, hergestellt. Dabei wurde der 2x HBSP-Puffer mit einer 1ml-Pipette unter das Präzipitat pipettiert und anschließend ca. 15 Luftblasen in das Präzipitat entlassen. Es folgte eine Inkubation von 20 Minuten bei Raumtemperatur. Abschließend wurde das Präzipitat gemischt und tropfenweise zu den Zellen dazugegeben. Der Mediumwechsel erfolgte 12-16 h

nach der Transfektion. Nach weiteren 48 h Inkubation wurde der Virusüberstand (10^2 - 10^3 cfu/ml) abgenommen, sterilfiltriert und zur erneuten Infektion der GP+E 86 Zellen eingesetzt.

4.2.2.2 *Tunikamycinbehandlung und Infektion*

Die virale Transduktion in eine Verpackungszelllinie erzeugt einen höheren Titer als die Transfektion mit Plasmid-DNA. Um den Eintritt des Virus in die Verpackungszelllinie zu gewährleisten, muss die Oberflächenexpression des viralen Gens env und zunächst inhibiert werden. Dazu wurde die GP+E 86 Verpackungszelllinie für 16h mit Tunikamycin, 100ng/ml vorbehandelt. Anschließend wurden 2ml des zuvor generierten Virusüberstandes (10^2 - 10^3 cfu/ml) und Polybren (8µg/ml) auf die sub-konfluente Verpackungszelllinie gegeben. Nach 24 h Inkubation erfolgte ein Mediumwechsel und der Beginn der negativen Selektion mittels G 418 (1mg/ml) für ca. 2 Wochen.

4.2.2.3 *Limited Dilution und Titerbestimmung*

Die polyklonale Verpackungszelllinie wurde mittels vIL-10 ELISA auf die Expression des Transgens getestet. Anschließend wurde zur Generierung einer monoklonalen Verpackungszelllinie mit einem hohen Titer eine Verdünnungsreihe („limited dilution“) nach folgendem Schema unter G 418 (1 mg/ml) Selektion angesetzt:

1x 96 well Platte mit 5 Zellen / well

2 x 96 well Platte mit 1 Zelle / well

1 x 96 well Platte mit 0,3 Zellen /well

Nach 3-4 wöchiger Selektion wurden 12 von insgesamt 24 gewachsenen Klonen mittels vIL-10 ELISA auf die Expression von vIL-10 getestet. Des weiteren wurde eine virale Titerbestimmung nach dem Protokoll von *Clontech* durchgeführt. Hierzu wurden 5×10^5 Zellen der Verpackungszelllinie in einer T 25 Kulturflasche für 48h inkubiert. Der Kulturüberstand wurde anschließend durch einen 0,45µm Filter sterilfiltriert und nach dem *Clontech* Protokoll analysiert, bzw. im ELISA quantifiziert. Der Klon mit der höchsten Transgen-Expression und dem höchsten viralen Titer wurde expandiert und mit einer Zellkonzentration von 1×10^7 Zellen/Tube in Flüssigstickstoff gelagert bzw. für alle weiteren Transduktionsexperimente verwendet.

4.2.3 Generierung der vIL-10 transgenen, allospezifischen T-Zelllinie (T_{vIL-10}-Lymphozyten)

4.2.3.1 Präparation des lymphatischen Gewebes

Bei allen Versuchen wurden die Rattenstämme Lewis (Le, RT1^l) und Dark Agouti (DA, RT1^{av}) verwendet. Die Lewis T-Lymphozyten dienten zur Generierung der alloantigen-spezifischen T-Zelllinien und als Empfängertiere bei den Transplantationen. Die DA-Ratten dienten als Stimulator-Zellen *in vitro* und als Organspender *in vivo*. Die Ratten wurden mittels eines Narkose- und Tötungsgerätes durch ein Carbogen-Kohlendioxid-Gasgemisch getötet. Als erstes wurde die Haut von der Muskelfaszie abpräpariert und es erfolgte eine sofortige Öffnung des Thorax zur kardialen Blutentnahme und Thymuspräparation. Anschließend wurden die zervikalen, axillären, inguinalen und dermalen Lymphknoten sauber aus dem umliegenden Gewebe isoliert und in DMEM-Medium zum Transport gelagert.

4.2.3.2 Gewinnung des autologen Serums

Zur Serumgewinnung wurde das kardial gewonnene Blut bei 4500 rpm, 4°C für 10 min zentrifugiert und der so entstandene Serumüberstand abgenommen.

4.2.3.3 Aufarbeitung der lymphatischen Gewebe

Zur Aufarbeitung der Lymphknoten und des Thymusgewebes wurden diese unter sterilen Bedingungen durch ein 100 µm Nylon-Zellstrainer gepresst, in DMEM 10% FKS aufgenommen und anschließend durch ein 40 µm Zellstrainer filtriert. Nach der Zentrifugation der Zellsuspension (1200rpm, 4°C, 5min) wurde das Pellet in T-Zell-Medium (TCM) aufgenommen und die Zellzahl bestimmt. Dieses erfolgte in einer Neubauer-Zählkammer mittels Vitalfärbung mit Trypan-Blau. Die so gewonnene Zellanzahl variierte, je nach Tiergröße und Präparation zwischen $1-1,5 \times 10^9$ Zellen je Thymus und $0,5-1,5 \times 10^8$ Zellen für die Lymphknoten. Für den Ansatz einer „primär-MLC“ wurden die als allogene Stimulatorzellen dienenden Lymphozyten der DA-Ratte mit 30 Gray bestrahlt. Für die Restimulationen wurden die Thymozyten der Lewis und DA Rattenstämme mit 30 Gray bestrahlt. Während der Bestrahlung und des Transportes der Zellen wurden diese auf Eis gelagert.

4.2.3.4 *Retrovirale Transduktion der Lymphozyten in der gemischten Lymphozytenkultur (MLC, mixed lymphocyte reaction)*

Zur Transduktion der Lymphozyten wurde die virusproduzierende Verpackungszelllinie GP+E vIL-10 mit einer Konzentration von 3×10^3 Zellen/well in eine 96-well Rundbodenplatte in einem Volumen von 50 μ l/well in TCM ausgesät. Es folgte eine 2-4 stündige Inkubation der Zellen im Brutschrank (37°C, 5 % CO₂) zur Zelladhäsion. Anschließend wurde die primäre MLC wie folgt hinzu gegeben:

Primär MLC:	3,5x10 ⁵	LE „responder“-Zellen
	+	3,5x10 ⁵ DA Stimulator-Zellen, bestrahlt mit 30 Gray
	+	8 μ g/ml Polybren
	+	2 % autologes Serum
		ad 50 μ l/well in TCM

Die 96-well Rundbodenplatten wurden für drei Tage im Brutschrank inkubiert. Danach wurden die Lymphozyten vorsichtig, ohne sie zu resuspendieren, in eine 96-well Flachbodenplatte überführt und mit 100 μ l TCM, 10 % Pferdeserum (56°C hitze-inaktiviert), 25 U/ml humanes Interleukin-2 versetzt. In Abhängigkeit der Proliferationsstärke und Morphologie der Lymphozyten, welche lichtmikroskopisch beobachtet wurden, wurde zwischen Tag 6-7 nach „primär-MLC“ mit der negativen Selektion der Lymphozyten durch Zugabe von 0,4 mg/ml G 418 zum Medium begonnen. Die erste Restimulation erfolgte am Tag 7-9. Die in regelmäßigen Abständen durchzuführende Aktivierung der primären Zellen ist notwendig, um die Zellen am Leben zu erhalten. Desweiteren werden die transgenen Zellen, durch ihre Proliferation während der Restimulation vermehrt.

4.2.3.5 *Restimulationen der T_{vIL-10}-Lymphozyten*

Zur Generierung einer allospezifischen, für vIL-10 transgenen T-Zelllinie wurden die Lymphozyten alle 7-9 Tage restimuliert. Die Restimulationen wurden mit einem Gemisch aus 30 Gray bestrahlter Lewis und DA-Thymozyten unter G 418 Selektion durchgeführt. Die erste Restimulation fand im 96-well Flachboden statt, da nach der „primär-MLC“ nur ca. 10-20 % der Lymphozyten retroviral transduziert sind, liegt die Zahl der T_{vIL-10}-Lymphozyten pro 96-well zwischen $3-7 \times 10^4$ Lymphozyten.

Restimulation im 96-well:	3-7 x 10 ⁴	T _{VIL-10} -Lymphozyten
+	3 x10 ⁵	LE Thymozyten, 30 Gray bestrahlt
+	3 x10 ⁵	DA Thymozyten, 30 Gray bestrahlt
+	2 %	autologes Serum
+	0,4 mg/ml	G-418
	ad 100 µl/96-well in TCM	

Nach 3 Tagen Inkubation wurden die Lymphozyten gepoolt und in einer Zellkonzentration von 1×10^6 Zellen/ml in 6cm Schalen in TCM (10 % Pferdeserum, 25U/ml huIL-2, 0,4 mg/ml G 418) ausgesät. Alle weiteren Restimulationen fanden im Abstand von 7-9 Tagen in der 6 cm Schale wie folgt statt:

Restimulation in der 6 cm Schale:	4 x 10 ⁶	T _{vIL-10} -Lymphozyten
+	3 x 10 ⁷	LE Thymozyten, 30 Gray bestrahlt
+	3 x 10 ⁷	DA Thymozyten, 30 Gray bestrahlt
+	2 %	autologes Serum
+	0,4 mg/ml	G-418
	ad 5ml TCM/ 6cm Schale	

Nach 3 Tagen Inkubation wurden die Lymphozyten mit TCM (10 % Pferdeserum, 25U/ml hu IL-2, 0,4 mg/ml G 418) versetzt und bei starker Proliferation auf 10 cm Schalen expandiert. Nach 3-5 Restimulationen wurden die Zellen in Einfriermedium (FKS, 10% DMSO) mit einer Zellkonzentration von 2×10^7 Zellen/Kryotube in Flüssigstickstoff gelagert. Die Einfrierungen erfolgten zwischen Tag 3-4 nach der letzten Restimulation. Für alle *in vitro* und *in vivo* Versuche wurden 3-5fach restimierte transgene T_{vIL-10}-Lymphozyten eingesetzt.

4.2.3.6 Aufreinigung der T_{VIL-10}-Lymphozyten

Zur Aufreinigung der T_{VIL-10}-Lymphozyten wurde ein modifizierter Ficoll-Gradient durchgeführt. Dieser erfolgte zur Abtrennung der bestrahlten, toten Thymozyten und Gewinnung der vitalen transgenen Blasten, einen Tag vor Ansatz der *in vitro* Versuche oder des adoptiven Transfers. Die Zellen einer 10cm Kulturschale wurden mit 1200rpm für 5min bei 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurde das Zellpellet in 15ml kalten Human-Ficoll resuspendiert und mit 5ml DMEM überschichtet. Die Auftrennung des Gradienten erfolgte bei 3000rpm für 30min bei 4°C. Nach der Abnahme des Leukozytenrings

aus der Interphase wurden die Zellen 2x mit FKS-haltigen DMEM-Medium gewaschen und mit einer Zellkonzentration von $1-2 \times 10^6$ Zellen/ml in TCM, 10% Pferde Serum kultiviert.

4.2.3.7 Herstellung allospezifischer T_{EGFP} -Lymphozyten und T_{MOCK} -Lymphozyten

Parallel zur Herstellung der allospezifischen vIL-10 transgenen T-Zelllinie wurden nach exakt demselben Protokoll zwei weitere T-Zelllinien hergestellt, die als Kontrollzellen in den *in vitro* und *in vivo* Versuchen eingesetzt wurden. Zum einen wurde eine allospezifische T-Zelllinie ohne Transgen (nicht-transgene Lymphozyten = T_{MOCK} -Lymphozyten) und zum anderen eine für das Reportergen EGFP transgene T-Zelllinie (T_{EGFP} -Lymphozyten) hergestellt.

4.2.3.8 Biologischer Aktivitätstest für vIL-10

Die biologische Aktivität von vIL-10 kann sowohl im Maus- und Ratten- als auch im humanen System nachgewiesen werden. Ein bereits bekannter Effekt von humanen IL-10 ist die Inhibierung der TNF- α Expression nach Aktivierung von humanen PBMCs. Aufgrund der hohen Homologie zwischen vIL-10 und hu IL-10 ist dieser Test auch mit vIL-10 durchführbar. Mit Hilfe des folgenden Versuchsansatzes wurde die biologische Aktivität von vIL-10, produziert von der Verpackungszelllinie, nachgewiesen. Humane periphere mononukleäre Blutlymphozyten (PBMC) wurden aus Heparin-Blut gewonnen. Der Versuch wurde nach Vorschrift des *Milenia ex vivo Stimulations-Kits* durchgeführt. Die PBMCs wurden mit 500pg/ml LPS stimuliert und für 4h bei 37°C inkubiert. Der Versuchsaufbau gliederte sich in:

- 1) Lymphozyten
- 2) Lymphozyten + 500pg/ml LPS
- 3) Lymphozyten + 500pg/ml LPS + 100ng/ml vIL-10 Überstand
- 4) Lymphozyten + 500pg/ml LPS + 10ng/ml vIL-10 Überstand
- 5) Lymphozyten + 500pg/ml LPS + 1ng/ml vIL-10 Überstand
- 6) Lymphozyten + 500pg/ml LPS + 50ng/ml rec. Hu IL-10
- 7) Lymphozyten + 500pg/ml LPS + 10ng/ml vIL-10 Überstand + 5 μ g/ml anti vIL-10 Ak
- 8) Lymphozyten + 500pg/ml LPS + 5 μ g/ml anti vIL-10 Ak

Nach der Inkubationszeit wurde die TNF- α Konzentration in Zellkulturüberstand der einzelnen Versuchsansätze am Immulite bestimmt.

4.2.4 Zytokinexpressionsuntersuchungen auf mRNA- und Protein-Ebene in der MLC

4.2.4.1 Zellkulturansatz

3-5fach restimierte T_{vIL-10} -Lymphozyten, T_{EGFP} -Lymphozyten und T_{MOCK} -Lymphozyten wurden in einer Konzentration von 1×10^5 Zellen mit je 3×10^5 bestrahlten LE und DA Thymozyten im 96-well Flachboden restimuliert und am Tag 2 mit TCM, 10% Pferdeserum, 25 U/ml hu IL-2, gefüttert. Am Tag 1-5 wurden die Zellen geerntet und Aliquots der Überstände, sowie das Zellpellet nach einmaligem Waschen der Zellen mit PBS bei -70°C weggefroren.

4.2.4.2 Proteinbestimmung

Zur Proteinbestimmung der Zellkulturüberstände wurden kommerzielle ELISA-Kits eingesetzt. Es wurde bei allen Proteinbestimmungen gemäß den Herstellervorgaben verfahren. Folgende Proteinbestimmungen wurden durchgeführt: vIL-10, rIFN- γ , rIL-2, rIL-10, rIL-4. Die Auswertung fand am *ELISA-reader Anthos 2001* statt.

4.2.4.3 mRNA-Analytik mittels Real-Time TaqMan PCR

Die mRNA-Isolation, cDNA-Synthese sowie die Durchführung der real-time TaqMan PCR wurde streng nach der Arbeitsanleitung (SOP) zur molekularbiologischen Bestimmung der Genexpression, erstellt 02/2001 im Institut für Medizinische Immunologie, durchgeführt.

4.2.4.3.1 RNA-Isolation

Die bei -70°C gelagerten Zellpellets wurden zur RNA-Präparation in jeweils 200 μl Lösung D mit 1,4 μl β -Mercaptoethanol (14,2 M) aufgenommen. Anschließend erfolgte sofort die RNA-Präparation mit dem „StrataPrep Total RNA Miniprep Kit“ von *Stratagene* nach Vorschrift des Herstellers. Die gewonnene RNA wurde in einem Volumen von $2 \times 20 \mu\text{l}$ eluiert und mit Hilfe des Agilent 2100 Bioanalyzer quantifiziert. Es wurde das dazugehörige Kit „RNA Reagents & Supplies“ und der RNA-Marker von *Ambion* verwendet.

4.2.4.3.2 cDNA-Synthese

Vor der cDNA-Synthese erfolgte, zusätzlich zu dem DNase-Verdau während der RNA-Präparation, ein weiterer DNase-Verdau, um eine mögliche Kontamination der RNA mit genomischer DNA zu beseitigen. Dazu wurden 2 μg RNA mit DEPC- H_2O auf ein Endvolumen

von 19µl gemischt. Nach der Zugabe von 2µl Random-Primer (0,1mg/ml) wurden die Proben gemischt und kurz abzentrifugiert. Anschließend wurde der Ansatz zur Beseitigung von Sekundärstrukturen für 10 Minuten bei 75°C im Thermocycler „TC1“ inkubiert. Pro Ansatz wurde ein Mix von 17,5µl wie folgt angesetzt:

8µl	First Strand Buffer (FSB)
4µl	Dithiothreitol (DTT/0,1M)
4µl	dNTP (2,5mM)
1µl	DNase (2U/µl)
0,5µl	RNase-Inhibitor (40U/µl)

Nach 2 min Inkubation der Proben auf Eis wurde je Probe 17,5µl Mix hinzupipettiert und vorsichtig gemischt. Anschließend folgte eine 30 minütige Inkubation bei 37°C, und darauf 5 min bei 75°C zur DNase-Inaktivierung. Die Proben wurden wieder für 2 min auf Eis gestellt und zu jeder Probe wurden jeweils 1µl Reverse Transkriptase (RT, 200U/µl) und RNase-Inhibitor (40U/µl) hinzugegeben. Die eigentliche cDNA-Synthese erfolgte bei 42°C für 60 Minuten. Zur Inaktivierung der Reversen Transkriptase wurden die Proben danach für 5 Minuten auf 94°C erhitzt. Die cDNA wurde bei –20°C gelagert. Die Testung der cDNAs erfolgte mittels der konventionellen PCR im Thermocycler 9600. Es wurde ein Primerpaar für das „house keeping gene“ HPRT benutzt. Die Annealingtemperatur betrug 65°C, die Zyklenzahl 30 und die Produktgröße 608 bp. Der Mix für eine Probe setzte sich wie folgt zusammen:

17,9µl	H ₂ O
2,5µl	PCR-Puffer (10xPuffer)
1,5µl	MgCl ₂ (25mM)
1,0µl	dNTPs (2,5mM)
0,5µl	Forward Primer (10pmol/µl)
0,5µl	Reverse Primer (10pmol/µl)
0,1µl	Taq-DNA Polymerase

Nach Beendigung der PCR wurde die korrekte Größe der amplifizierten Produkte mittels Gelelektrophorese und anschließender Auswertung mit Hilfe des „Gel-Imager-Systems“ kontrolliert.

Analog zu der beschriebenen cDNA-Synthese wurde für jede Probe ein paralleler Ansatz ohne RT angesetzt. Diese Proben wurden in der folgenden „real-time“ TaqMan PCR als Kontrollen eingesetzt, um eine mögliche Kontamination der Proben mit genomischer DNA zu detektieren.

Die real-time TaqMan PCR ist eine sensitive, reproduzierbare und spezifische Methode zur Quantifizierung von mRNA. Bei dieser Methode kann die Amplifikation der Proben nach Abschluß der PCR sofort für jeden Zyklus analysiert werden, so dass keine weiteren post-PCR-Arbeitsschritte erforderlich sind. Neben den spezifischen Primern für das nachzuweisende Gen wird eine sequenzspezifische Oligonukleotid-Sonde in die PCR eingesetzt. Diese ist am 5'-Ende mit einem fluoreszenten Reporter-Farbstoff (6-Carboxyfluorescein, FAM) und am 3'-Ende mit einem Quencher-Farbstoff (6-Carboxy-tetramethyl-rhodamin, TAMRA) markiert. Ist die Sonde, die zwischen den spezifischen Primern bindet, intakt an der komplementären DNA gebunden, so wird die Fluoreszenz des Reporter-Farbstoffes bei einer Fluoreszenzanregung auf Grund der räumlichen Nähe zum Quencher, durch einen Fluoreszenz-Energietransfer unterdrückt. Trifft während der Extensionsphase der PCR die Taq-Polymerase auf die hybridisierte Sonde, so wird diese durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Polymerase hydrolysiert. Es kommt zum Sondenbruch, und damit zur räumlichen Trennung der Farbstoffe, so dass das Fluoreszenzsignal des Reporter-Farbstoffes nicht mehr unterdrückt wird. Das Reportersignal steigt also in Abhängigkeit zu der Anzahl der PCR-Zyklen an, wobei der sogenannte Threshold Cycle (C_T-Wert) die Zyklenzahl ausdrückt, bei der zum ersten Mal ein statistisch signifikanter Anstieg der Reporter-Fluoreszenz über die Grundlinie erfaßt wird. Die Detektion des Fluoreszenzanstieges erfolgt für jeden Zyklus im geschlossenen Reaktionsgefäß mit Hilfe des ABI PRISM™ 7700 Sequence Detection Systems.

Zur Erstellung der Zytokinexpressionsmuster (Zeitkinetik Tag 1-5) der 3-4fach restimulierten nicht-transgenen, vIL-10 transgenen und EGFP transgenen Lymphozyten wurden folgende TaqMan-Panel und Sonden verwendet.

rat GAPDH fw:	5'-GAT GCT GGT GCT GAG TAT GTC GT-3'
rat GAPDH rev:	5'-TCA GGT GAG CCC CAG CCT-3'
rat GAPDH Sonde:	5'-TCT AC TGGC GTC TTC ACC ACC ATG GAG A-3'
rat CD25 fw:	5'-CAC AGT CTG TGT ACC AGGAGA ACC T-3'
rat CD25 rev:	5'-CCA CGA AGT GGT AGA TTC TCT TGG-3'
rat CD25 Sonde:	5'-CAG GTC ACT GCA GGG AGC CCC C-3'
rat IFN-γ fw:	5'-AAC AGT AAA GCA AAA AAG GAT GCA TT-3'
rat IFN-γ rev:	5'-TTC ATT GAC AGC TTT GTG CTG G-3'
rat IFN-γ Sonde:	5'-CGC CAA GTT CGA GGT GAA CAA CCC-3'

rat CD-3 fw:	5'-CAA AGA AAC TAA CAT GGA GCA GGG-3'
rat CD-3 rev:	5'-CTT TTT GCT GGG CCA TGG T-3'
rat CD-3 Sonde:	5'-AGG TTT GGC TGG CCT CTT CCT GGT G-3'
rat IL-2 fw:	5'-CTC CCC ATG ATG CTC ACG TT-3'
rat IL-2 rev:	5'-TCA TTT TCC AGG CAC TGA AGA TG-3'
rat IL-2 Sonde:	5'-CAA TTC TGT GGC CTG CTTGGG CAA-3'
vIL-10 fw:	5'-GAC CCT GAA GCC AAA GAC CAT-3'
vIL-10 rev:	5'-CAG GAA CCT GTG GCA CCT G-3'
vIL-10 Sonde:	5'-AAA TCT AAA GAC CCT ACG GCT CCG CCT G-3'
rat IL-10 fw:	5'-GAA GAC CCT CTG GAT ACA GCT GC-3'
rat IL-10 rev:	5'-TGC TCC ACT GCC TTG CTT TT-3'
rat IL-10 Sonde:	5'-CGC TGT CAT CGA TTT CTC CCC TGT GA-3'
rat INOS fw:	5'-TTC CCA TCG CTC CGC TG-3'
rat INOS rev:	5'-CCG GAG CTG TAG CAC TGC A-3'
rat INOS Sonde:	5'-AAC ACA GTA ATG GCC GAC CTG ATG TTG C-3'
rat β -Actin fw:	5'-GTA CAA CCT CCT TGC AGC TCC T-3'
rat β -Actin rev:	5'-TTG TCG ACG ACG AGC GC-3'
rat β -Actin Sonde:	5'-CGC CAC CAG TTC GCC ATG GAT-3'
rat Bag fw:	5'-CAG CTA ACC ACC TGG AAG AGT TG -3'
rat Bag rev:	5'-GAG CCT CCG CTT GTA ATT CCT T-3'
rat Bag Sonde:	5'-TTC TGA CAT CCA GCA GGG TTT TCT GGC-3'
rat bcl-2 fw:	5'-TGA ACC GGC ATC TGC ACA-3'
rat bcl-2 rev:	5'-CAG AGG TCG CAT GCT GGG-3'
rat bcl-2-Sonde:	5'-AAC GGA GGC TGG GAT GCC TTT GTG-3'
rat FasL fw:	5'-ACC AAC CAC AGC CTT AGA GTA TCA TC-3'
rat FasL rev:	5'-CTG TTA AGT GGG CCA CAC TCC TT-3'
rat FasL Sonde:	5'-AAA GCA AAT AGC CAA CCC CAG CAC ACC-3'

Die Primer und Sonden wurden mit Hilfe der Primer Express Software ermittelt. Die Etablierung des Primerpaares, die Primertitration und die Effizienzbestimmung mittels Standardkurvengenerierung wurden am Institut für Medizinische Immunologie (Charité Berlin) von Technischen Assistenten nach Vorschrift der SOP durchgeführt.

Zur Durchführung der PCR wurden folgende Bedingungen gewählt:

Zykler 9600: 1 Zyklus 50°C 2 min
 1 Zyklus 95°C 10 min
 40 Zyklen 95°C 15 s
 60°C 1 min

	Probe	RT negativ Probe
TM-Mastermix	12,5µl	12,5µl
Steriles Wasser	4,5µl	4,5µl
Primermix	6µl	6µl
Sonde	1µl	1µl
Template	1µl	1µl

4.2.4.3.4

Relative Quantifizierung

Der durch die „real-time“ PCR ermittelte „Threshold Cycle“ (C_T) gibt an, bei welchem Zyklus das erste Mal ein statistisch signifikanter Anstieg der Reporter Fluoreszenz meßbar ist. Je höher die Kopienanzahl der Probe, desto kleiner ist der C_T -Wert. Eine relative Quantifizierung der Expressionshöhe ist möglich, indem ein konstitutiv exprimiertes Gen („house keeping gene“, bei T-Zellen z.B. CD 3) derselben cDNA Probe amplifiziert wird.

Die Bildung des ΔC_T -Wertes erfolgt nach folgender Formel:

$$\Delta C_T = MW C_T (\text{Zielsequenz}) - MW C_T (\text{„house keeping gene“})$$

Das dimensionslose Ergebnis wird wie folgt angegeben:

$$\text{Ergebnis} = 2^{-\Delta C_T}$$

Voraussetzung für diese Auswertungsmethode ist, dass die jeweiligen Bedingungen für die Primer- und Sondenpaare so gewählt sind, dass die Effizienzen der Amplifikation nahezu gleich bzw. im idealen Fall 1 sind. In diesem Fall kann von einer Verdopplung der Kopienzahl von Zyklus zu Zyklus ausgegangen werden.

4.2.5 Proliferations-Test in der MLC

Zur Analyse des Einflusses von T_{VIL-10}-Lymphozyten auf die Proliferation von naiven T-Lymphozyten bei gleichzeitiger allogener Aktivierung wurde folgender Versuch angelegt:

	syngen	allogen	allogen + T _{VIL-10} -Zellen	allogen + T _{EGFP} -Zellen
Lewis T-Zellen	4x10 ⁵	4x10 ⁵	4x10 ⁵	4x10 ⁵
Lewis T-Zellen (bestrahlt)	4x10 ⁵			
DA T-Zellen (bestrahlt)		4x10 ⁵	4x10 ⁵	4x10 ⁵
T_{VIL-10}-Zellen			2x10 ⁴	
T_{EGFP}-Zellen				2x10 ⁴
autologes Serum	2 %	2 %	2 %	2 %

Tabelle 2: Proliferations-Test, Versuchsaufbau.

Die naiven Lewis-Lymphozyten wurden zuvor mit dem Membran-Farbstoff SNARFTM angefärbt, um sie eindeutig von den Stimulatorzellen zu unterscheiden. Hierfür wurden die Zellen zwei Mal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden sie mit einer Konzentration von 1x10⁷ Zellen/ml in einer 5µM SNARF-PBS Verdünnung für 4 min bei RT gefärbt. Es folgten drei Waschschrte mit 10% FCS haltigen Medium. Nach der Markierung der Zellen wurden die Ansätze nach der Tab.2 zusammen pipettiert und für 3 bzw. 4 Tage im Brutschrank, 5% CO₂, 37°C inkubiert. Am Tag 1 nach Versuchsansatz folgte die Einstellung der zu analysierenden Proben am FACS-Gerät. Da der Fluoreszenzfarbstoff SNARF bei der Zellteilung zu gleichen Teilen an die Tochterzellen weitergegeben wird, erfolgt eine Abnahme der Fluoreszenzintensität der Zellen, die sich geteilt haben. Die Proliferationsmessung erfolgte am Tag 3 und 4 mittels Durchflußzytometrie (FACS).

4.2.6 Intrazelluläre IFN- γ Färbung in der MLC

Zur Analyse des Einflusses von T_{vIL-10}-Lymphozyten auf die IFN- γ Produktion von naiven T-Lymphozyten bei gleichzeitiger allogener Aktivierung wurden folgende Versuche in TCM angesetzt:

	syngen	allogen	allogen + T _{vIL-10} -Zellen
Lewis T-Zellen	4x10 ⁵	4x10 ⁵	4x10 ⁵
Lewis T-Zellen (bestrahlt)	4x10 ⁵		
DA T-Zellen (bestrahlt)		4x10 ⁵	4x10 ⁵
T _{vIL-10} -Zellen			2x10 ⁴
autologes Serum	2 %	2 %	2 %

Tabelle 3: Intrazelluläre IFN- γ Färbung, Versuchsaufbau.

Analog zu dem Proliferations-Test wurden die naiven T-Zellen vor dem Versuch mit dem in der Fluoreszenz 1 strahlenden Membran- und Proteinfarbstoff CFDA-SE markiert. Die Färbung erfolgte nach exakt demselben Protokoll wie die SNARF-Färbung. Die Zellen wurden anschließend wie in Tab.3 dargestellt zusammen pipettiert. Für die intrazelluläre IFN- γ Färbung am Tag 4 wurden die Ansätze zunächst für 3h mit PMA (10ng/ml) und Ionomycin (1 μ g/ml) inkubiert zur Verstärkung der schon vorhandenen Transkriptionsaktivität. Anschließend erfolgte die Zugabe von Brefeldin A (5 μ g/ml), einem Sekretionsblocker, über einen Zeitraum von 3h. Für die Färbung wurden die Zellen zentrifugiert (1200rpm, 5 min, 4°C) in 300 μ l FACSTM Permeabilisierungs-Lösung aufgenommen und für 15 min im dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Darauf folgend wurde 800 μ l einer 0,2 %igen Saponin/PBS Lösung zu den Proben hinzugegeben und wiederum zentrifugiert (1200rpm, 5 min, 4°C). Alle Antikörper und Isotypenkontrollen wurden gemäß den Herstellerangaben für die Färbung eingesetzt. Die Antikörper-Färbung selbst wurde nach sorgfältigem Durchmischen der Proben bei 4°C für 15 min durchgeführt. Anschließend erfolgte nach einmaligen Waschen mit FACS-Puffer eine Fixierung der Zellen in 2% PFA. Die Messung wurde am Durchflußzytometer (FACS) nach Beendigung der intrazellulären IFN- γ Färbung durchgeführt.

4.2.7 Durchflußzytometrische Analysen der T_{vIL-10}-Lymphozyten

Eine Phänotypisierung der 3-4fach restimulierten T_{vIL-10}-Lymphozyten erfolgte mit den monoklonalen Antikörpern gegen TCR, CD4, CD8, CD25, L-Selektin und IFN- γ im Durchflußzytometer (FACS). Alle Antikörper wurden nach Angaben des Herstellers eingesetzt. Die Färbung erfolgte für 15 min bei 4°C. Anschließend wurden die Zellen mit FACS-Puffer gewaschen und mit 2% PFA in PBS fixiert. Die intrazelluläre IFN- γ Färbung wurde wie im Kapitel 4.2.6 beschrieben durchgeführt.

4.2.8 Einfluß von Cyclosporin A auf die Zytokinproduktion

Um den Einfluß von Cyclosporin A auf die IFN- γ Produktion und die Transgen-Expression der T_{vIL-10}-Lymphozyten zu untersuchen wurden 1×10^5 T_{vIL-10}-Lymphozyten mit je 3×10^5 bestrahlten Lewis und DA Thymozyten in TCM, 2% autologes Serum je 96-well ausgesät. Gleichzeitig erfolgte die Zugabe von Cyclosporin A in den Konzentrationen 500ng/ml, 200ng/ml, 100ng/ml, 10ng/ml und 0ng/ml. Nach 48 Stunden wurden die Zellen mit TCM, 10% Pferde Serum, huIL-2 (25U/ml) versetzt. Die Zellkulturüberstände wurden am Tag 1-5 abgenommen und für die Proteinanalytik bei -70°C gelagert. Die IFN- γ und vIL-10 Proteinbestimmung erfolgte durch kommerzielle ELISA-Kits, welche nach Vorschrift durchgeführt wurden.

4.2.9 Heterotrope Herztransplantation und adoptiver T-Zelltransfer

Die Transplantationen wurden von unserem Mikrochirurgen Dr. Jun Yang durchgeführt. Als Empfänger-Tiere dienten männliche adulte Inzucht Lewis (Le, RT-1^l) Ratten und als Donor Dark Agouti (DA, RT-1^{avl}, MHC I/II inkompartibel) Ratten mit einem Gewicht von 200-250 g. Empfänger und Donor Ratten wurden vor der Operation mit Gemisch aus Ketavet und Rompun intramuskulär anästhesiert. Die Transplantation wurde nach dem Protokoll von Ono und Lindsey durchgeführt (Ono et al, 1969). Die durchschnittliche Ischämie-Zeit betrug weniger als 25 min. Der adoptive Transfer der T_{vIL-10}-Lymphozyten oder T_{MOCK}-Lymphozyten erfolgte sofort nach Beendigung der Transplantation in die Penisvene des Empfängertieres. Zur Analyse des Migrationsverhaltens der PKH 26 markierten Zellen wurden diese Tag 1 nach der Transplantation nach demselben Protokoll appliziert.

4.2.10 PKH 26 Markierung der T_{vIL-10}-Lymphozyten

Zur Analyse des spezifischen „homing“-Verhaltens der T_{vIL-10}-Lymphozyten und T_{MOCK}-Lymphozyten wurden diese vor dem adoptiven Transfer mit dem „PKH 26 red fluorescent cell linker kit“ markiert. Die große Stabilität und lange Halbwertszeit dieses Farbstoffes macht ihn zur idealen Technologie, um die Zellverteilung und Zellwanderung *in vivo* zu untersuchen. Die Markierung der Zellen wurde streng nach dem Hersteller-Protokoll (Sigma) durchgeführt. Nach der Markierung wurden die Zellen mit PBS gewaschen und in einer Konzentration von 15×10^6 Zellen/500 μ l zur *in vivo* Applikation aufgenommen.

4.2.11 Histologische Auswertung der PKH 26 markierten T_{vIL-10}-Lymphozyten

Nach adoptivem Transfer von PKH 26 markierten T_{vIL-10}-Lymphozyten und T_{MOCK}-Lymphozyten wurde die Anzahl der infiltrierenden Zellen im Transplantat und in Rezipienteneigenen Organen (Herz, Leber, Lunge und Milz) bestimmt. Die Analyse erfolgte am Tag 4 nach Transplantation bzw. Tag 3 nach adoptivem Transfer. Hierzu wurden von den in flüssigem Stickstoff gelagerten Geweben 5 μ m dünne Kryostatschnitte angefertigt, auf einen mit Gelatine überzogenen Objektträger überführt und mit Crazy Glue fixiert. Die Auszählung der PKH26 markierten T-Lymphozyten erfolgte mit Hilfe des Zählgitters im Okular am Lasermikroskop. Es wurden 5 Sektionen mit 250 Gesichtsfeldern ausgezählt (Gesichtsfeld: 0,159 mm²). Die Anzahl der PKH 26 markierter Zellen wurde in Zellen/mm² berechnet.

4.2.12 Cyclosporin A Behandlung im Transplantationsmodell

Für die Cyclosporin-Kombinationstherapie wurden den Empfänger-Tieren beginnend am Tag -1 (vor Transplantation) 0,5 mg/kg/Tag Cyclosporin A s. c. appliziert. Die Transplantationen und der adoptive Transfer wurde wie bereits beschrieben durchgeführt.

5 Ergebnisse

5.1 Generierung des retroviralen pLXSN vIL-10 Vektors

Als Ausgangsvektor für die Klonierung diente pBluescript vIL-10, als Zielvektor pLXSN.

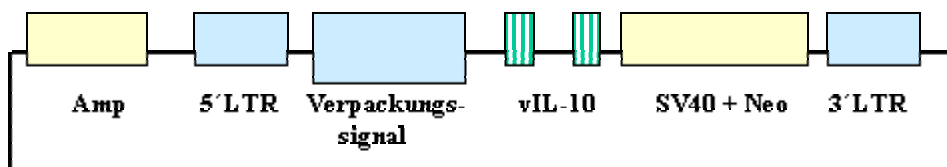


Abbildung 4: pLXSN vIL-10 Vektor

```
ATGGAGCGAAGGTTAGTGGTCACTCTGCAGTGCCTGGTGCTGCTTTACCTGGCACCTGAGTGTGGAGGTACAGA  
CCAATGTGACAATTTTCCCAAATGTTGAGGGACCTAAGAGATGCCTTCAGTCGTGTTAAAACCTTTTCCAGAC  
AAAGGACGAGGTAGATAACCTTTTGGTCAAGGAGTCTCTGCTAGAGGACTTTAAGGGCTACCTTGGATGCCAGG  
CCCTGTCAGAAATGATCCAATTCTACCTGGAGGAAGTCATGCCACAGGCTGAAAACCAGGACCCTGAAGCCAAA  
GACCATGTCAATTCTTTGGGTGAAAATCTAAAGACCCTACGGCTCCGCCTGCGCAGGTGCCACAGGTTCTCTGCC  
GTGTGAGAACAAGAGTAAAGCTGTGGAACAGATAAAAAATGCCTTTAACAAGCTGCAGGAAAAAGGAATTTAC  
AAAGCCATGAGTGAATTTGACATTTTATTAACATACATAGAAGCATACATGACAATTAAAGCCAGGTGA
```

Abbildung 5 : DNA-Sequenz vIL-10 (kodierender Bereich)

Der für vIL-10 kodierende Bereich wurde mit den Restriktionsenzymen BamH I und EcoR V aus dem Vektor pBluescript herausgeschnitten, gleichzeitig wurde die „multiple-cloning-site“ des Klonierungsvektors pLXSN mit den Enzymen BamH I und Hpa I geöffnet. Da die Enzyme EcoR V und Hpa I „blunt-end-cutter“ sind, konnte eine direkte Klonierungsstrategie angewendet werden. Nach der Auftrennung des Klonierungsvektors und des vIL-10 Fragments im 1,5%igen Agarosegel, wurden die DNA-Fragmente mittels Jetsorb-Kit von Genomed aus dem Gel isoliert, und es folgte die Ligation des vIL-10 in den retroviralen Vektor pLXSN über Nacht bei 14°C. Anschließend wurde der Ligationsansatz in kompetente DH5α *E.coli* Zellen transformiert, auf antibiotikahaltigen LB-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die gewachsenen Klone wurden mittels „Mini“-Plasmidpräparation und anschließender Restriktion charakterisiert. Zur Herstellung einer großen Menge Plasmid-DNA wurde der „Maxi-Prep-Kit“ von Qiagen verwendet. Zur Langzeitlagerung wurden Glycerol-Stocks, der mit pLXSN-vIL-10 transformierten *E.coli* Bakterien, bei -70°C angelegt. Die vIL-10 DNA wurde sequenziert und auf ihre Richtigkeit überprüft (Abb.5).

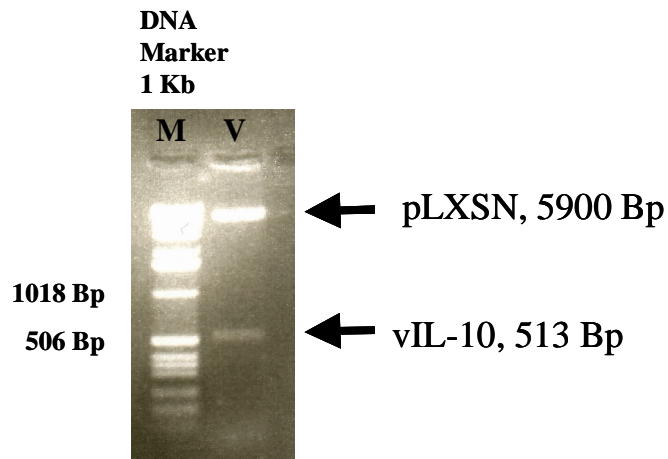


Abbildung 6: Generierung des Vektors pLXSN vIL-10. Restriktionsverdau des retroviralen Vektors pLXSN-vIL-10 mit EcoR I und BamH I und anschließender gelelektrophoretischer Auftrennung der DNA-Fragmente im 1,5%igen Agarosegel (M = 1kb Marker, V = pLXSN-vIL-10 nach Restriktionsverdau).

5.2 Generierung der retroviralen Verpackungszelllinie GP+E vIL-10

Zunächst wurde die Verpackungszelllinie GP + E 86 mit dem retroviralen Vektor pLXSN vIL-10, mittels Calcium-Phoshat Transfektion transfiziert. Der virale Titer dieser polyklonalen, nicht-stabilen Verpackungszelllinie liegt 48 h nach der Transfektion bei 1×10^2 - 1×10^3 cfu/ml. Dieser geringe Titer reicht nicht aus, um primäre T-Lymphozyten zu transduzieren. Eine Transduktion dieses Virenüberstandes (1×10^2 - 1×10^3 cfu/ml) in eine nicht transduzierte Verpackungszelllinie hingegen führt zu einem weitaus höheren Virustiter der Zelllinie. Dieses liegt darin begründet, dass es bei der viralen Transduktion zu einer bedeutend besseren Aufnahme der Virus-RNA kommt, als es bei der Transfektion von Plasmid-DNA der Fall ist. Die höhere Aufnahme an Virus-RNA führt zu einer höheren Virusproduktion, und damit zu einem wesentlich höheren Virustiter der Verpackungszelllinie. Die Verpackungszelllinien sind gentechnologisch dahingehend verändert, dass sie stabil die viralen Gene gag, env und pol exprimieren. Diese Gene kodieren für die Virushülle (env), retrovirale Enzyme (pol) und für die virale Strukturmatrix (gag). Durch die stabile Expression der Proteine für die Virushülle werden die auf der Verpackungszelllinie exprimierten viralen Rezeptoren blockiert, so dass das Eindringen eines Virus über diesen Rezeptor verhindert wird. Eine Tunikamycinbehandlung der Verpackungszelllinie führt zur Inhibierung der Oberflächenexpression des viralen Gens env, welches eine Transduktion des Virus in die

Verpackungszelllinie erst ermöglicht. Zur Generierung einer Verpackungszelllinie mit einem hohen Titer wurde der vorhandene Virusüberstand mit geringem Titer (1×10^2 - 1×10^3 cfu/ml) 48h nach der Transfektion geerntet, mittels $0,45 \mu\text{m}$ Filter steriltfiltriert und zu einer nicht-transduzierten GP + E 86 Verpackungszelllinie hinzugegeben, die zuvor für 16h mit Tunikamycin inkubiert wurde. Einen Tag nach der Transduktion wurde mit der negativen Selektion mittels G 418 begonnen, so dass ausschließlich die transduzierten Zellen mit dem retroviralen Vektor und dem Resistenzgen überleben konnten. Für die Generierung eines monoklonalen, stabilen Verpackungszelllinien-Klones wurde die polyklonale GP + E vIL-10 Zelllinie in einer definierten Verdünnungsreihe („Limited Dilution“) in 96-well Platten unter G 418 Selektion ausplattiert. Diese Methode ermöglicht eine Selektionierung auf Einzel-Zell-Ebene. Während der 3-4 wöchigen Kultivierung wachsen Zellkolonien, die aus einer einzelnen Zelle hervorgegangen sind. Insgesamt wurden 24 Klone isoliert, expandiert und teilweise weiter analysiert. In der Verpackungszelllinie findet parallel zur Transkription und Verpackung der Viren auch die Translation und Sekretion der viralen Gene inklusive des Transgens statt. Dadurch ist auch das verwendete Transgen vIL-10 im virushaltigen Überstand der Verpackungszelllinie zu detektieren. Zwölf der insgesamt vierundzwanzig entstandenen Verpackungszelllinien-Klone für vIL-10 transgene Retroviren wurden hinsichtlich ihrer vIL-10 Expression im ELISA analysiert. Es konnte eine Expressionshöhe von über 500 ng/ml vIL-10 in einer der klonierten Verpackungszelllinien detektiert werden (Abb.7).

vIL-10 ng/ml

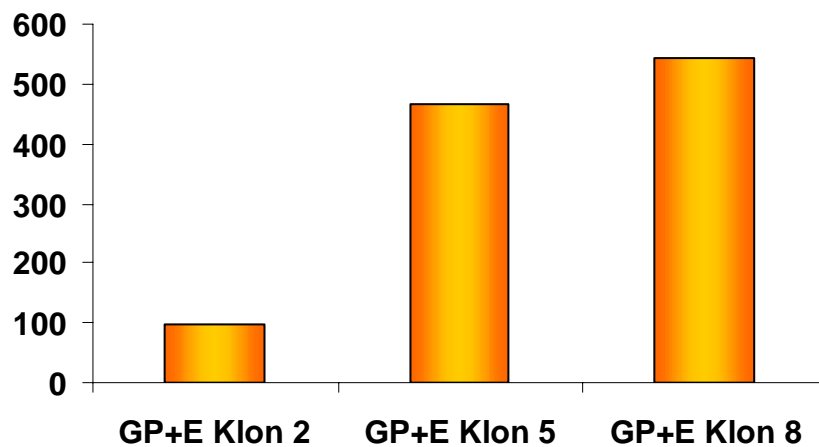


Abbildung 7: vIL-10 Expression der Verpackungszelllinien-Klone. 3×10^6 Zellen/T75 Kulturflasche wurden für 48 h inkubiert. Die vIL-10 Expression von drei ausgewählten Klonen ist dargestellt.

Zum Nachweis dafür, dass die Verpackungszelllinie nicht nur das Transgen vIL-10 im hohen Ausmaß exprimiert, sondern auch ein infektiöses Virus bildet, wurde im Anschluss an den vIL-10 ELISA eine Titerbestimmung durchgeführt. Die Expressionshöhe des Transgens im Zellkulturüberstand korreliert mit der Höhe des Virus-Titers (pers. Mitteilung A. Flügel, MPI für Neurobiologie, Abt. Neuroimmunologie, München), d.h. eine hohe vIL-10 Expression bedeutet auch einen hohen Titer. Der virale Titer (cfu/ml) des Verpackungszelllinien-Klons 8 betrug $3\text{-}5 \times 10^6$ cfu/ml (Tab.4). Mit diesem Klon wurden alle weiteren Experimente durchgeführt.

	viraler Titer, (cfu/ml)
GP + E vIL-10	$3\text{-}5 \times 10^6$ cfu/ml
GP + E EGFP	$2\text{-}3 \times 10^7$ cfu/ml

Tabelle 4: Virale Titer der Verpackungszelllinien. 5×10^5 Zellen/5ml wurden für 48 h kultiviert. Der viraler Titer des Zellkulturüberstandes der GP+E Verpackungszelllinien mit vIL-10 oder EGFP als Transgen ist dargestellt (n = 5).

5.3 Bioaktivitätstest für vIL-10

Um zu untersuchen, ob das retroviral exprimierte vIL-10 noch seine biologische Aktivität besitzt, wurde eine Bioaktivitätstest für vIL-10 durchgeführt. Aufgrund der hohen Homologie zwischen vIL-10 und huIL-10 konnte ein humanes Testsystem angewendet werden. vIL-10 ist ebenso im Ratten- und Maussystem biologisch wirksam. Die Stimulation von humanen PBMCs mit LPS (500pg/ml) induziert die TNF- α Freisetzung durch Monozyten und B-Zellen. Diese ist blockierbar durch die Zugabe von rekombinanten humanen IL-10. Zur Testung der Bioaktivität von vIL-10 wurde das inhibitorische Potential des Zytokins auf die TNF- α Freisetzung von PBMCs nach LPS-Stimulation mittels Immulite-Technologie untersucht. vIL-10 inhibiert die TNF- α Produktion um ca. 80% bei einer eingesetzten Konzentration von 100ng/ml bzw. 10ng/ml und um ca. 30% bei 1ng/ml vIL-10 (Abb.8). Die Inhibierung konnte aufgehoben werden durch Zugabe eines neutralisierenden anti vIL-10 Antikörpers, womit der spezifische Effekt gezeigt werden konnte. Die Bioaktivität des von der Verpackungszelllinie gebildeten vIL-10 konnte somit durch diesen Versuch nachgewiesen werden.

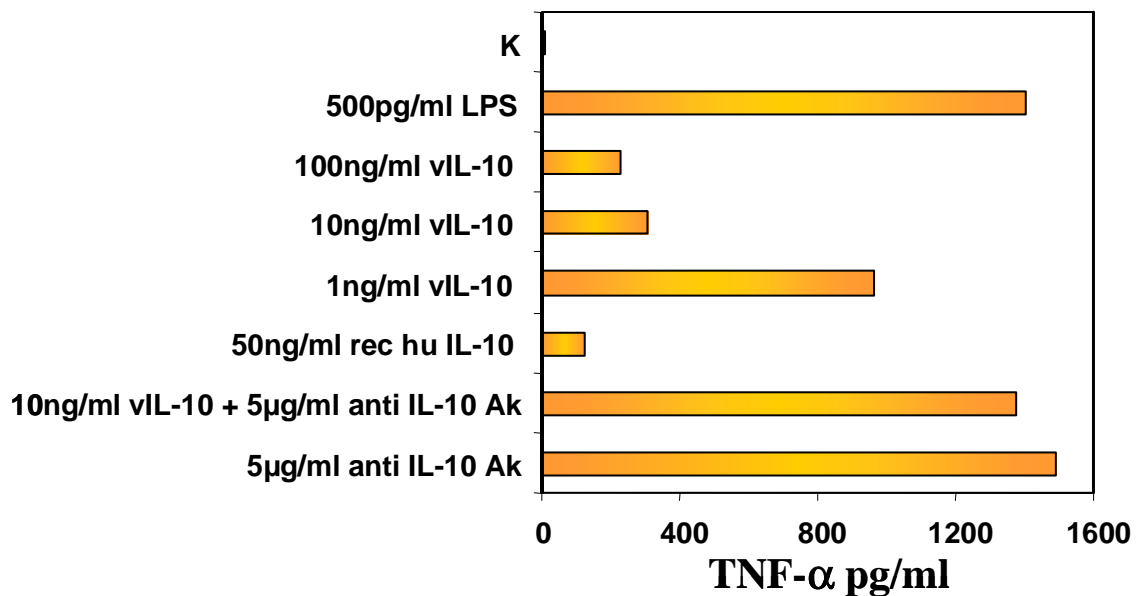


Abbildung 8: Inhibierung der LPS induzierten TNF- α Produktion durch vIL-10. PBMCs wurden 4h mit LPS (500pg/ml) und verschiedenen Konzentrationen von vIL-10, rek. hu IL-10 und einem neutralisierenden anti vIL-10 Antikörper (Ak) inkubiert. Dargestellt ist ein repräsentativer Versuch (n=3).

5.4 Generierung der retroviral modifizierten, alloantigen spezifischen T-Zelllinie (T_{vIL-10}-Lymphozyten)

Die Herstellung der T_{vIL-10}-Lymphozyten erfolgte durch die Kombination von zwei zellbiologischen Methoden: der Virustransduktion und der gemischten Lymphozyten-Kultur (MLC). In einer Kokultur wurden $3,5 \times 10^5$ Lymphozyten einer Lewis-Ratte mit $3,5 \times 10^5$ bestrahlten (30 Gray) Lymphozyten einer DA-Ratte und 3×10^3 vIL-10-Virus produzierenden Verpackungszellen pro Vertiefung in einer 96-well Rundboden-Platte in TCM, 2% autologes Serum, 8µg/ml Polybren für 72 Stunden kultiviert. Während der MLC werden die T-Lymphozyten alloantigen-spezifisch aktiviert, und es kommt zur polyklonalen Proliferation. Die Proliferation wiederum ist die Voraussetzung für eine erfolgreiche retrovirale Transduktion, da es während der mitotischen Zellteilungsphase zur Auflösung der Kernmembran kommt und somit erst die Integration des Retrovirus in das Wirtsgenom ermöglicht wird. Am Tag drei erfolgte die Abtrennung der Lymphozyten von der adhärenenten Verpackungszelllinie durch die Überführung der Zellen in 96-well Flachboden-Platten. Die Transduktionseffizienz betrug zu diesem Zeitpunkt 10-20% der Lewis-Lymphozyten. Des weiteren wurden die Zellen zur Verstärkung der Proliferation mit TCM, 10% Pferde-Serum, 25 U/ml rekombinantem humanem IL-2 gefüttert. Am Tag 7 nach der primären MLC erfolgte die erste Restimulation der T_{vIL-10}-Lymphozyten unter G 418 Selektion (0,4 mg/ml). Das Neomycin-Resistenzgen wurde durch das Retrovirus in die Zellen eingeführt, wodurch eine positive Selektion der transduzierten Zellen ermöglicht wurde. Die Restimulationen wurden mit einem Gemisch aus bestrahlten Lewis- und DA-Thymozyten in einem Abstand von sieben Tagen durchgeführt. Ziel dieser Restimulationsschritte war, eine ausreichend große Population der für DA-Allogene spezifische und gleichzeitig für vIL-10 transgene T-Zelllinie zu generieren. Die T_{vIL-10}-Lymphozyten wurden in einer Konzentration von ca. 2×10^7 Zellen/Einfrierröhrchen in flüssigem Stickstoff gelagert und für alle *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen eingesetzt.

Die vIL-10 Produktion von 5×10^5 T_{vIL-10}-Lymphozyten/24h/200µl betrug 1-3 ng/ml vIL-10 (Abb.9). Physiologisch gesehen ist dies eine hohe Expression, da IL-10 *in vivo* meistens nur in sehr geringen Konzentrationen vorliegt.

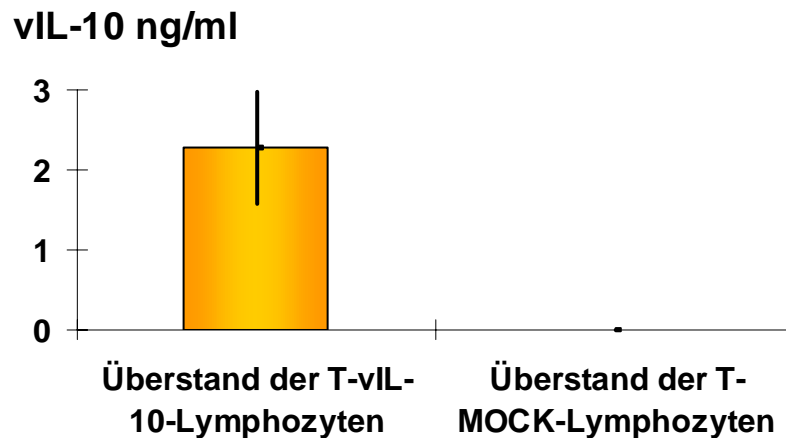


Abbildung 9: vIL-10 Produktion der T_{vIL-10}-Lymphozyten. 5×10^5 T_{vIL-10}-Lymphozyten bzw. T_{MOCK}-Lymphozyten wurden in 200 μ l TCM-Medium für 24h inkubiert. Die Zellkulturüberstände wurden mittels ELISA analysiert (n=5).

5.5 Charakterisierung der T_{vIL-10}-Lymphozyten

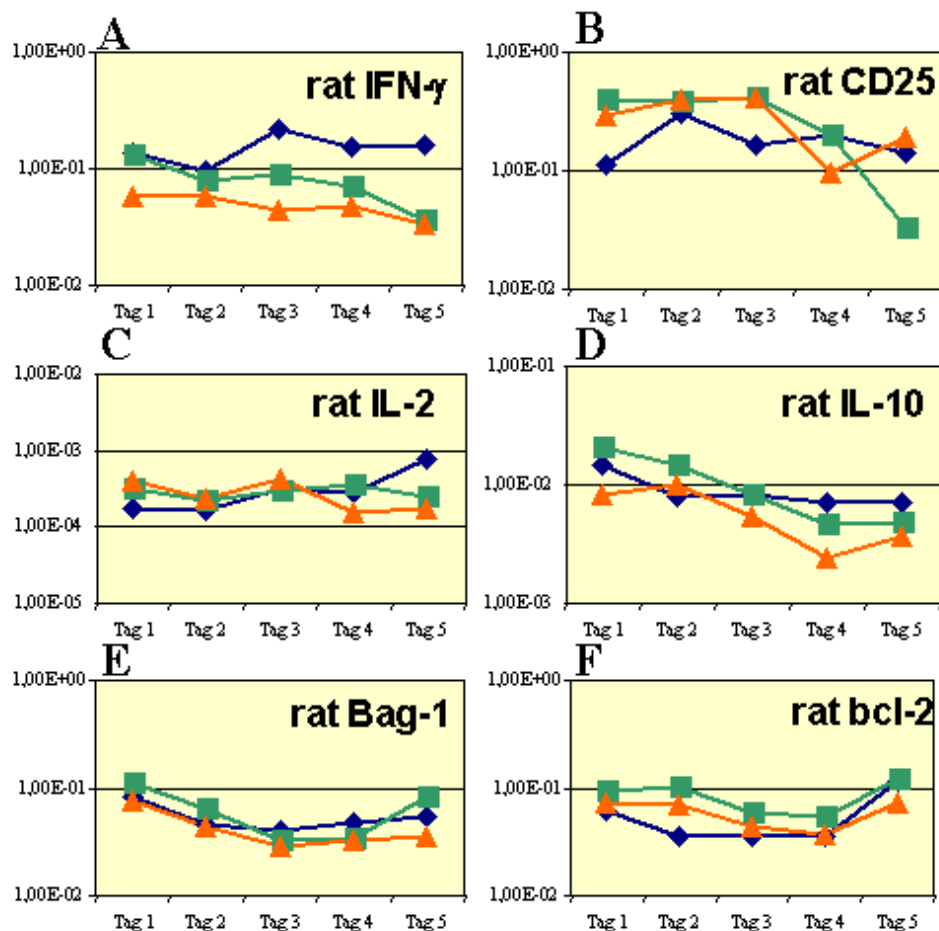
Zur biologischen Charakterisierung der T_{vIL-10}-Lymphozyten wurden Untersuchungen zur

- 1) mRNA-Expression (TaqMan-Technologie)
- 2) Sekretion von Proteinen (ELISA)
- 3) und Oberflächenexpression membranständiger Proteine (FACS-Technologie)

durchgeführt.

Zunächst wurden 3-fach restimierte T_{vIL-10}-Lymphozyten hinsichtlich ihres Zytokinexpressionsmusters auf Protein- und mRNA-Ebene untersucht. Die Analysen erfolgten in einer Zeitkinetik über 5 Tage nach der dritten Restimulation. Als Kontrolle wurden 3-fach restimierte T_{EGFP}-Lymphozyten bzw. T_{MOCK}-Lymphozyten mitgeführt. Diese Gegenüberstellung sollte neben der Charakterisierung der T_{vIL-10}-Lymphozyten Aufschluss darüber geben, inwieweit die retrovirale Transduktion selbst, bzw. die Wahl des therapeutischen Gens, zu signifikanten Unterschieden im Zytokinexpressionsmuster auf Protein- und mRNA-Ebene der Zellen führte. Auf mRNA-Ebene wurden mittels „real-time“

Taqman-PCR die Expression der Gene rCD25, rIFN- γ , rIL-2, rIL-10, rINOS, rFasL, rBcl2, rBag-1 und vIL-10 analysiert (Abb.10). Als „house-keeping“ Gen wurde bei allen TaqMan-Analysen das mit dem TCR assoziierte Polypeptid CD3 verwendet. Mit der TaqMan-Technologie ist nur eine relative Quantifizierung möglich. Es können keine absoluten mRNA-Mengen, sondern ausschließlich die Menge einer bestimmten mRNA in bezug auf die Expression des „house keeping gens“ derselben cDNA angegeben werden. Das Ergebnis wird mathematisch als $2^{-\Delta CT}$ dargestellt. Der Vergleich verschiedener cDNAs untereinander ist möglich durch die Bildung von $2^{-\Delta\Delta CT}$. Um eine Regulierung von CD3 auszuschließen, wurden zusätzliche Kontrollansätze für die „house-keeping“ Gene GAPDH und beta-Aktin mitgeführt (Daten nicht gezeigt). Bei dem Vergleich der verschiedenen Zelllinien wurden keine signifikanten Unterschiede im Zytokinexpressionsmuster auf mRNA-Ebene gefunden.



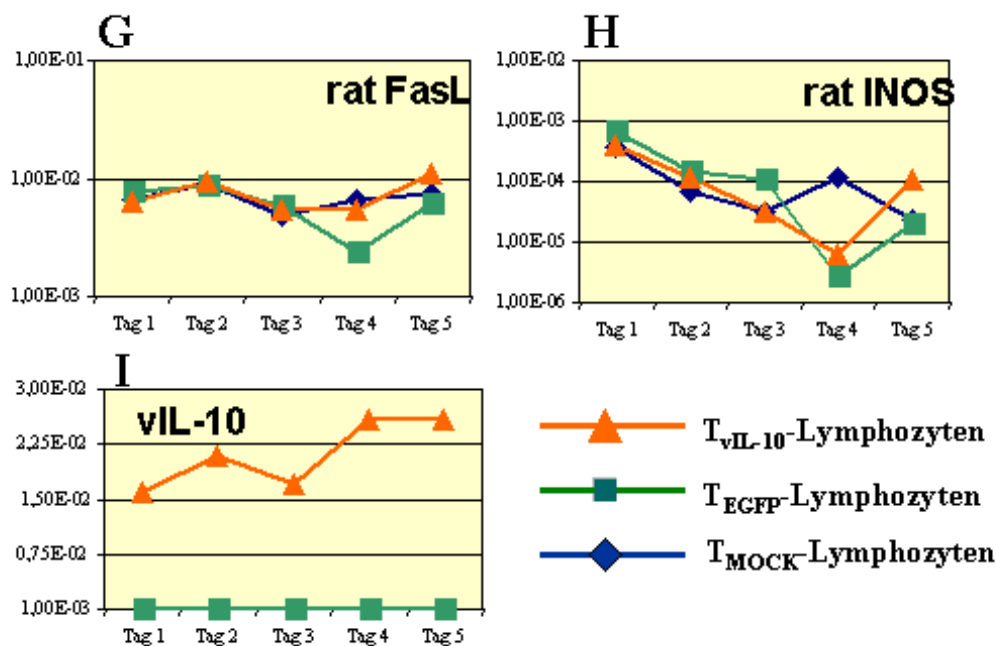


Abbildung 10: Zytokinexpressionsmuster auf mRNA-Ebene von T_{vIL-10}-Lymphozyten, T_{EGFP}-Lymphozyten und T_{MOCK}-Lymphozyten. 3-4fach restimulierte T_{vIL-10}-Lymphozyten, T_{EGFP}-Lymphozyten und T_{MOCK}-Lymphozyten wurden in einer Konzentration von 1×10^5 Zellen mit je 3×10^5 bestrahlten LE und DA Thymozyten im 96-well Flachboden restimuliert. Am Tag 1-5 wurden die Zellen geerntet. Nach der RNA-Isolation und cDNA-Synthese wurden die Proben mittels TaqMan PCR analysiert. **A)** rat IFN- γ ; **B)** rat CD25; **C)** rat IL-2; **D)** rat IL-10; **E)** rat Bag-1; **F)** rat bcl-2, **G)** rat FasL, **H)** rat INOS, **I)** vIL-10. Als „house-keeping“ Gen wurde CD3 verwendet. Dargestellt ist die relative Expressionshöhe der Moleküle als dimensionsloses Ergebnis bezogen auf CD3.

Auf Protein-Ebene wurden mittels ELISA die sekretierten Proteine rIFN- γ , rIL-2, rIL-10, vIL-10 und rIL-4 untersucht (Abb.11). Bei dem Vergleich der verschiedenen Zelllinien wurden keine signifikanten Unterschiede im Zytokinexpressionsmuster auf Protein-Ebene gefunden.

Die T_{MOCK}-Lymphozyten zeigten die höchste Expression von IFN- γ und die geringsten IL-10 Werte. Bei den T_{vIL-10}-Lymphozyten wurden die geringsten IFN- γ und die höchsten IL-10 Protein-Werte detektiert. IL-2 wurde in allen Zelllinien nur in geringer Konzentration nachgewiesen. vIL-10 wurde, wie zu erwarten, ausschließlich in den T_{vIL-10}-Lymphozyten detektiert (Abb.11).

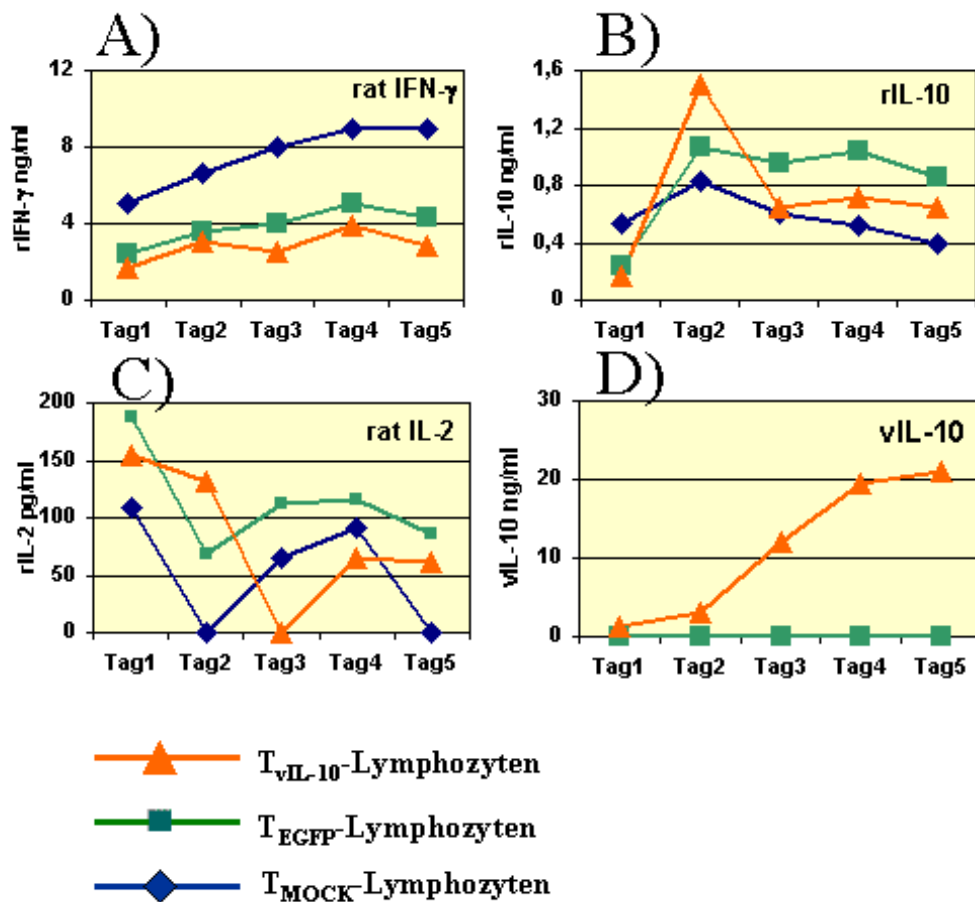


Abbildung 11: Proteinexpressionsmuster von T_{vIL-10}-Lymphozyten, T_{EGFP}-Lymphozyten und T_{MOCK}-Lymphozyten. 3-4fach restimulierte T_{vIL-10}-Lymphozyten, T_{EGFP}-Lymphozyten und T_{MOCK}-Lymphozyten wurden in einer Konzentration von 1×10^5 Zellen mit je 3×10^5 bestrahlten LE und DA Thymozyten im 96-well Flachboden restimuliert. Am Tag 1-5 wurden die Zellenkulturüberstände abgenommen und im ELISA gemessen. **A)** rat IFN-γ; **B)** rat IL-10; **C)** rat IL-2, **D)** vIL-10. Ein repräsentatives Ergebnis ist dargestellt (n = 3).

Eine zusammenfassende Darstellung der Zytokinexpressionsmuster der 3 Zelllinien auf mRNA- und Protein-Ebenen ist in Tabelle 5 abgebildet.

	T_{vIL-10}-Lymphozyten		T_{EGFP}-Lymphozyten		T_{MOCK}- Lymphozyten	
Molekül	mRNA	ELISA	mRNA	ELISA	mRNA	ELISA
IFN-γ	+	+	+	+	+	+
IL-2	+	+	+	+	+	+
IL-4	n.g.	unterhalb der Nachweisgrenze	n.g.	unterhalb der Nachweisgrenze	n.g.	unterhalb der Nachweisgrenze
IL-10	+	+	+	+	+	+
virales IL-10	+	+	Ø	Ø	Ø	Ø
CD25	+	n.g.	+	n.g.	+	n.g.
INOS	+	n.g.	+	n.g.	+	n.g.
FasL	+	n.g.	+	n.g.	+	n.g.
Bag-1	+	n.g.	+	n.g.	+	n.g.
Bcl-2	+	n.g.	+	n.g.	+	n.g.

Tabelle 5 : Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse auf mRNA- und Protein-Ebene (+ = sehr geringe Expression; ++ = geringe Expression, +++ = hohe Expression, ++++ = sehr hohe Expression; Ø = nicht vorhanden; n.g. = nicht gemessen).

Eine weitere Phänotypisierung der T_{vIL-10}-Lymphozyten fand mittels FACS-Analyse statt. Die Zellen wurden im FACS als CD4⁺, CD25⁺ (aktivierungsabhängig) und TCR⁺ identifiziert, wohingegen CD8 und L-Selektin nur auf einer geringen Prozentzahl (<10%) der Zellen exprimiert wurden (Tab.6).

	T_{vIL-10}-Lymphozyten / FACS	ELISA
TCR	> 90% positiv	-
CD4	> 90% positiv	-
CD8	< 10% negativ	-
CD25	> 90% positiv	-
L-Selektin	< 5% positiv	-
IFN-γ	> 90% positiv	positiv
IL-4	-	negativ

Tabelle 6: Oberflächenmarker und Zytokinprofil der T_{vIL-10}-Lymphozyten. 1×10^6 T_{vIL-10}-Lymphozyten wurden mit direkt markierten monoklonalen Ak gegen TCR, CD4, CD8, CD25, L-Selektin und IFN-γ angefärbt und mittels FACS analysiert. Zellkulturüberstände der Zellen wurden im ELISA auf IFN-γ und IL-4 untersucht (n = 3).

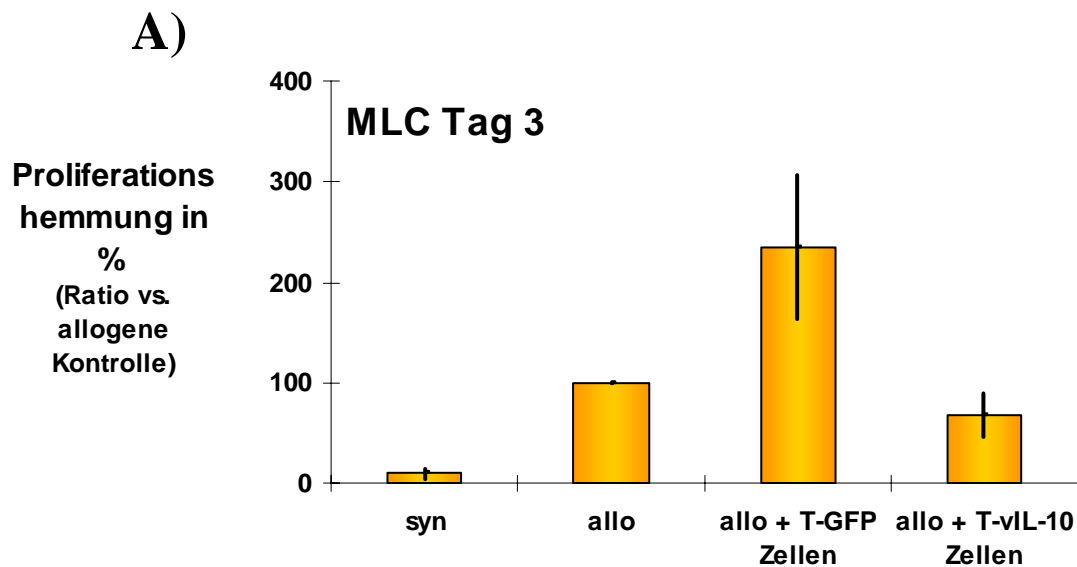
5.6 Funktionstests der T_{vIL-10}-Lymphozyten *in vitro*

Bei der akuten Rejektion spielen Transplantat-infiltrierende T-Lymphozyten eine große Rolle. Diese Zellen zeichnen sich durch ein ausgeprägtes Th1 Zytokinexpressionsmuster aus. Sie produzieren IL-2 und IFN-γ, und weisen eine starke Proliferation auf. In den folgenden zwei Funktionstests wurden die *in vitro* generierten alloantigen-spezifischen T_{vIL-10}-Lymphozyten auf ihr immunomodulatorisches Potential getestet, die Proliferation bzw. IFN-γ Produktion in naiven T-Lymphozyten nach allogener Stimulation zu hemmen.

5.6.1 Einfluss der T_{vIL-10}-Lymphozyten auf die Proliferation naiver T-Zellen

Bei der gemischten Lymphozyten-Kultur werden die Stimulator-Zellen (DA) bestrahlt, so dass ausschließlich die „responder“ T-Zellen (LE) allogen-spezifische aktiviert werden und proliferieren. Um den Einfluss von T_{vIL-10}-Lymphozyten auf die Proliferation von naiven T-Zellen während der allogenen Stimulation zu untersuchen, wurde folgender Versuch entwickelt. Zu einer Standard-MLC ($3,5 \times 10^5$ LE, $3,5 \times 10^5$ DA (irr)) wurden 5% alloantigen-spezifische T_{vIL-10}-Lymphozyten hinzugegeben (Simulation einer Situation, wie sie im Transplantat vorstellbar ist) und für 3 bzw. 4 Tage im Brutschrank inkubiert. Die naiven Lewis

T-Lymphozyten wurden vor dem Zellkulturansatz mit dem Membranfarbstoff SNARF markiert. Dieses war notwendig, um die naiven T-Lymphozyten von den allogenen DA T-Zellen und T_{vIL-10} -Lymphozyten im FACS zu unterscheiden. Bei einer Zellteilung wird der Membranfarbstoff zu gleichen Teilen an die Tochterzellen abgegeben, so dass die Abnahme der Fluoreszenzintensität ein Maß für die Proliferationsstärke der T-Zellen darstellt. Nach 3 bzw. 4 Tagen erfolgte die Auswertung am Durchflußzytometer (FACS) an Hand der Fluoreszenzstärke der mit SNARF markierten Lymphozyten. Die Fluoreszenzintensität ist als Verhältnis der mittleren SNARF Fluoreszenzstärke - bezogen auf die allogene Kontrolle - dargestellt. Eine Inhibierung der Proliferation naiver T-Zellen am Tag 3 und 4 der MLC durch Kokultivierung mit T_{vIL-10} -Lymphozyten konnte nachgewiesen werden (Abb.12). Als Kontrollen dienten MLC-Ansätze mit 5% alloantigen-spezifische T_{EGFP} -Lymphozyten, MLC-Ansätze ohne transgene Zellen, sowie syngene Ansätze ($3,5 \times 10^5$ LE, $3,5 \times 10^5$ LE (irr)). Die Inhibierung der Proliferation von naiven T-Zellen durch T_{vIL-10} -Lymphozyten betrug am Tag 3 ca. 15% und am Tag 4 der MLC ca. 30%, bezogen auf die Proliferation der allogenen Kontrolle. EGFP-transgene T-Lymphozyten hingegen führten sogar zu einer gesteigerten Proliferation der naiven T-Zellen auf über 200% am Tag 3 und ca. 150% am Tag 4 der MLC, bezogen auf die Proliferation der allogenen Kontrolle.



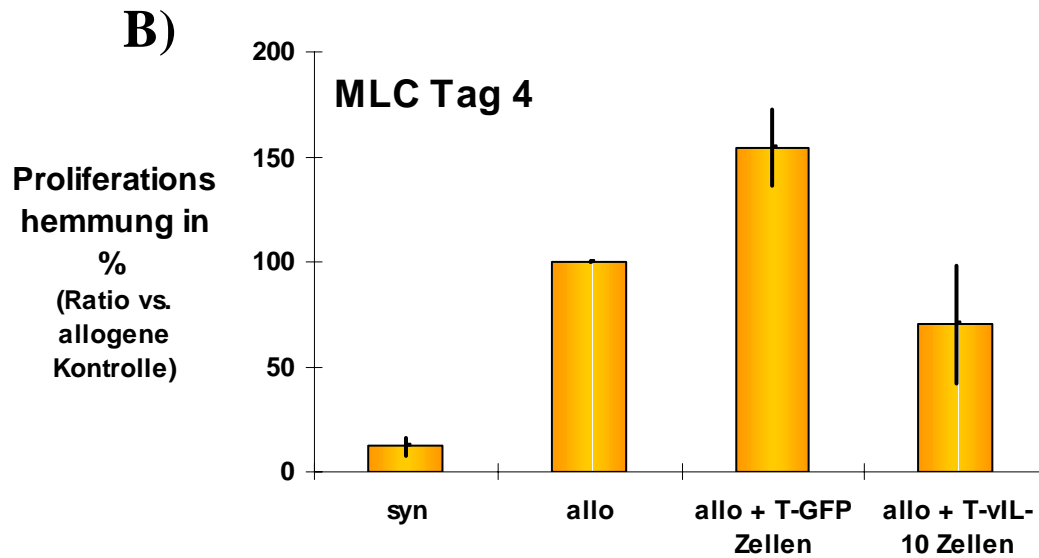


Abbildung 12: Inhibierung der Proliferation von naiven T-Lymphozyten durch T_{vIL-10} -Lymphozyten bei gleichzeitiger allogener Stimulation. Die naiven LE-Lymphozyten wurden vor dem Versuch mit dem Membranfarbstoff SNARF markiert. $3,5 \times 10^5$ LE-Lymphozyten wurden durch bestrahlte DA-Lymphozyten ($3,5 \times 10^5$) allogen stimuliert, bei gleichzeitiger Inkubation mit 5% T_{vIL-10} -Lymphozyten oder T_{EGFP} -Lymphozyten. Nach 3 (A) bzw. 4 Tagen (B) erfolgte die Auswertung am FACS-Gerät an Hand der Fluoreszenzstärke der mit SNARF markierten Lymphozyten. Die Daten sind als Verhältnis der mittleren SNARF Fluoreszenz-Intensität bezogen auf die allogene Kontrolle dargestellt. Syn = syngene Stimulation mit bestrahlten LE-Lymphozyten; allo = allogene Stimulation mit bestrahlten DA-Lymphozyten. Die Standardabweichung zeigen die Variationen innerhalb von 5 Experimenten ($n = 5$). Signifikanz: allo/ $vIL-10$ $p < 0,05$ Mann-Whitney-Test; allo/EGFP $p < 0,01$ T-Test; $vIL-10$ /EGFP $p < 0,01$ T-Test.

5.6.2 Einfluss der T_{vIL-10}-Lymphozyten auf die IFN- γ Produktion naiver T-Zellen

Analog zu den Proliferations-Untersuchungen wurde ein ähnlicher Versuchsaufbau entwickelt, um den Einfluss von alloantigen-spezifischen T_{vIL-10}-Lymphozyten auf die IFN- γ Produktion von naiven LE-Lymphozyten bei gleichzeitiger allogener Stimulation zu analysieren. Zur Unterscheidung der naiven Lymphozyten von den Stimulator-Zellen und den T_{vIL-10}-Lymphozyten wurden diese vor Versuchsbeginn mit dem kovalent bindenden Fluoreszenzfarbstoff CFDA-SE markiert. Dieser Farbstoff ist im Kanal 1 des FACS-Gerätes detektierbar. Zu Standard-MLCs ($3,5 \times 10^5$ LE, $3,5 \times 10^5$ DA (irr)) wurden 5% T_{vIL-10}-Lymphozyten hinzugegeben. Als Kontrolle dienten syngene und allogene MLCs ohne Kokultur mit vIL-10 transgenen Zellen. Zur Analyse des Einflusses von alloantigen-spezifischen T_{EGFP}-Lymphozyten wurden diese ebenfalls in einer Konzentration von 5% zu einer Standard MLC hinzugegeben, wobei in diesem Ansatz die naiven T-Lymphozyten nicht CFDA-SE markiert wurden, da die EGFP-transgenen Zellen ebenfalls im Kanal 1 zu detektieren sind. Im Laufe des Versuches stellte sich heraus, dass durch die Permeabilisierung der Zellmembran während der intrazellulären IFN- γ Färbung die EGFP-Moleküle aus den Zellen austreten, so dass die Fluoreszenzintensität der T_{EGFP}-Lymphozyten deutlich abnimmt. Aufgrund der unterschiedlichen Versuchsbedingungen (keine CFDA-SE Markierung der naiven T-Zellen bei Ko-Kultivierung mit T_{EGFP}-Lymphozyten) sind die Ergebnisse nicht in Abb.14 dargestellt.

Nach 4 Tagen Inkubation wurden die Zellen zunächst für 3h mit dem Mitogen PMA/Ionomycin stimuliert und anschließend mit dem Sekretionsblocker BrefeldinA weitere 3h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen intrazellulär mit einem PE-markierten Antikörper gegen IFN- γ angefärbt (Kanal 2). Es konnte eine signifikante Inhibierung der IFN- γ Produktion in naiven T-Lymphozyten nachgewiesen werden. In Abbildung 13 sind exemplarisch eine allogene Kokultur mit T_{vIL-10}-Lymphozyten und T_{EGFP}-Lymphozyten sowie eine syngene und allogene Kontrolle im Dot-Plot dargestellt.

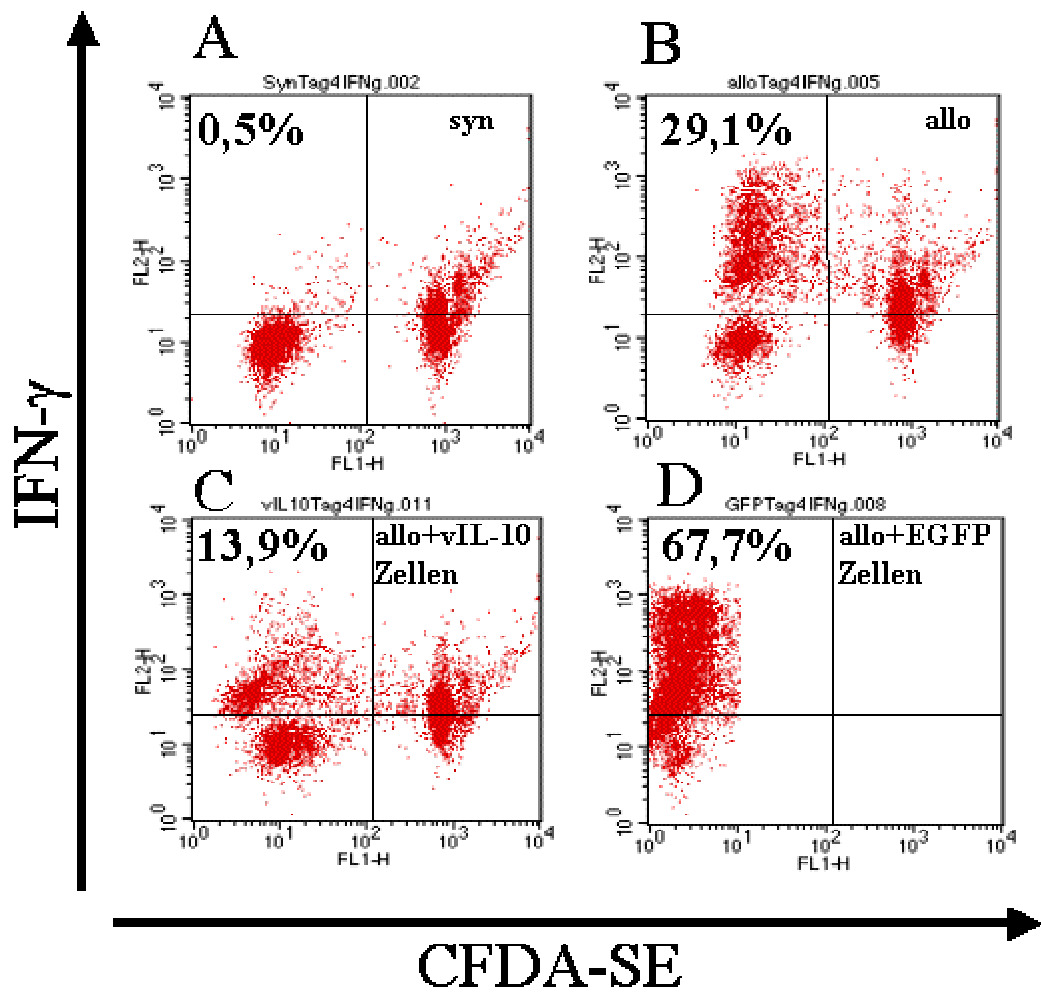


Abbildung 13: Intrazelluläre IFN- γ Expression naiver T-Lymphozyten nach Kokultur mit T_{vIL-10}-Lymphozyten oder T_{EGFP}-Lymphozyten bei gleichzeitiger allogener Stimulation. Die naiven LE T-Lymphozyten wurden vor der Kokultur mit CFDA-SE markiert, außer für den Ansatz mit T_{EGFP}-Lymphozyten (EGFP strahlt selbst im Kanal 1). Kokulturansatz: **A**) syn: $3,5 \times 10^5$ LE, $3,5 \times 10^5$ LE (irr); **B**) allo: $3,5 \times 10^5$ LE, $3,5 \times 10^5$ DA (irr); **C**) vIL-10: allo, 5% T_{vIL-10}-Lymphozyten; **D**) EGFP: allo, 5% T_{EGFP}-Lymphozyten. Nach 4 Tagen Inkubation erfolgte die intrazelluläre IFN- γ Färbung nach vorheriger Stimulation mit PMA/Ionomyzin in Gegenwart des Sekretionsblockers BrefeldinA. Die Daten sind im Dot-Blot CFDA-SE gegen IFN- γ PE dargestellt. Ein repräsentatives Experiment ist dargestellt (n=5).

Sowie die Anzahl der IFN- γ produzierenden Zellen als auch die Expressionshöhe wurde durch die Kokultur mit T_{vIL-10}-Lymphozyten um ca. 50% inhibiert (Abb.14). Bei einem weiteren Versuch wurden die Ko-Kulturansatz ausschließlich alloantigen-spezifisch stimuliert ohne PMA/Ionomycin. Auch in diesen Versuchen konnte eine Inhibierung der IFN- γ Synthese detektiert werden, die bei ca. 30% lag (Daten nicht gezeigt).

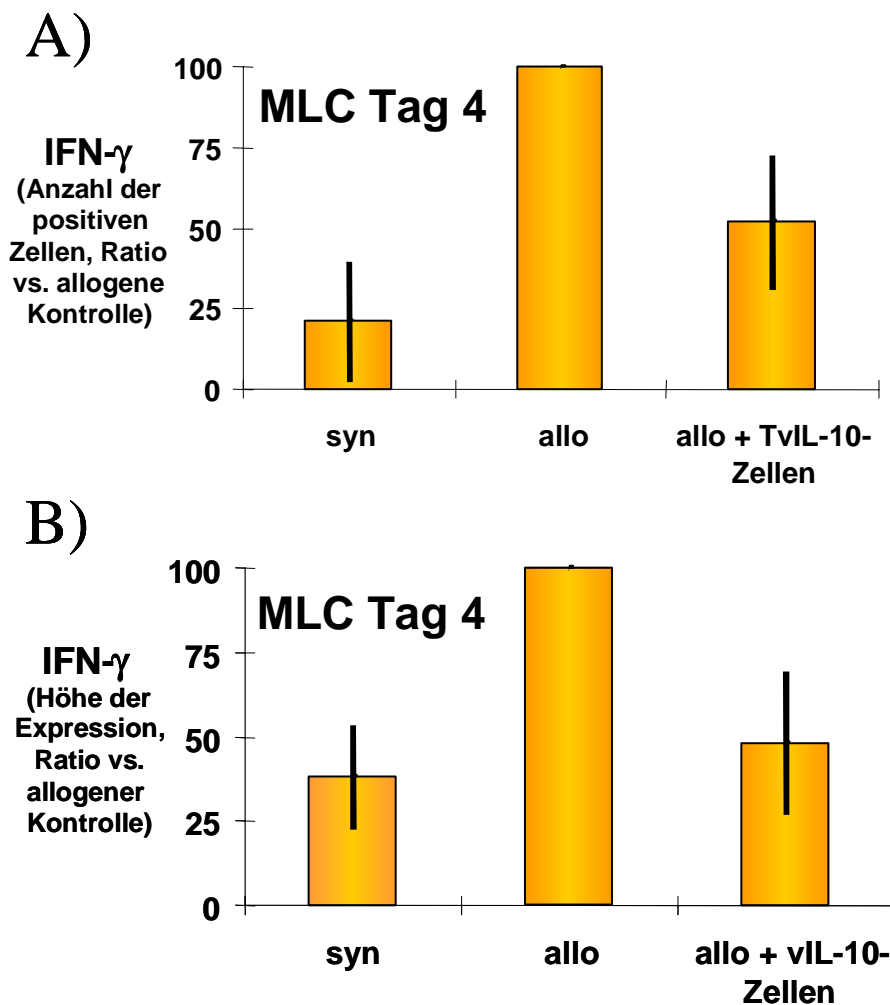


Abbildung 14: Intrazelluläre IFN- γ Expression naiver T-Lymphozyten nach Kokultur mit T_{vIL-10}-Lymphozyten. Die Daten sind als Verhältnis der mittleren IFN- γ Fluoreszenz-Intensität zwischen allogener Kontrolle und Versuchsansatz dargestellt. **A)** Anzahl der IFN- γ positiven Zellen; **B)** Mittlere Fluoreszenz Intensität (MFI) der IFN- γ positiven Zellen. Syn = Stimulation mit bestrahlten LE-Lymphozyten; allo = Stimulation mit bestrahlten DA-Lymphozyten; vIL-10 = allo + 5% T_{vIL-10}-Lymphozyten. Die Standardabweichung zeigen die Variationen innerhalb 5 Wiederholungen (n=5). Signifikanz: A) allo/vIL-10 p<0,05 Mann-Whitney-Test; B) allo/vIL-10 p<0,05 Mann-Whitney-Test.

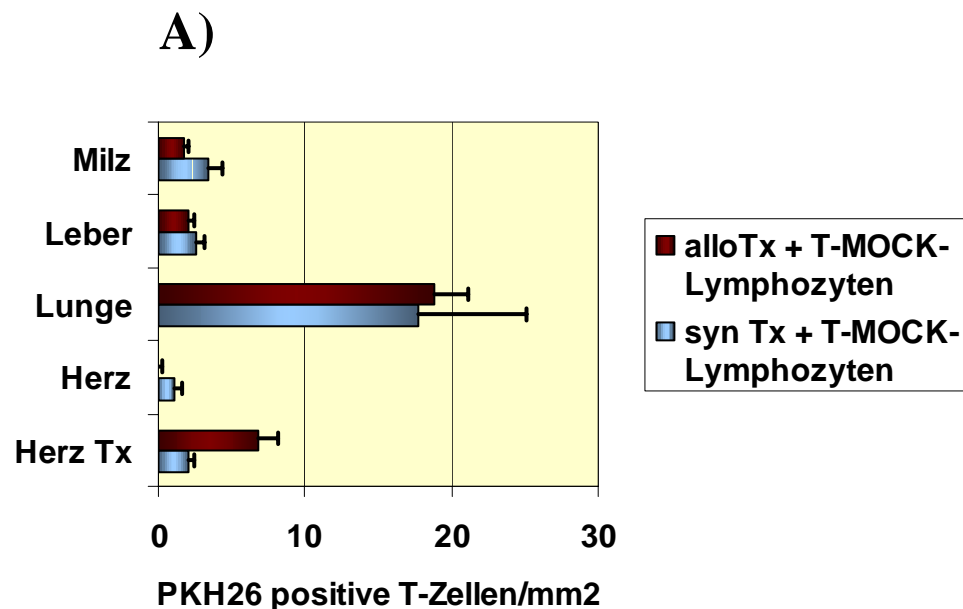
5.7 Migrations- und Funktionsanalysen der T_{VIL-10}-Lymphozyten nach adoptivem Transfer im allogenen Herz-Transplantationsmodell

Nach Abschluss der erfolgreichen *in vitro* Untersuchungen wurden die T_{VIL-10}-Lymphozyten hinsichtlich ihres immunmodulatorischen Potentials *in vivo* mittels adoptivem Transfer im Ratten-Herz-Transplantationsmodell getestet. Als Empfänger-Tiere dienten männliche adulte Inzucht Lewis (LE, RT1^l) Ratten und als Spender-Tiere Dark Agouti (DA, RT1^{av1}) Ratten. Es wurde also eine donorspezifische Transplantation in gleicher Stammkombination wie bei der Generierung der transgenen alloantigen-spezifischen T-Lymphozyten gewählt. Das DA Spender-Herz wurde heterotop in das Abdomen des Empfängertieres transplantiert. Die erfolgreiche Transplantation wurde an Hand des Herzschlages des Transplantates täglich festgestellt. Bei einem rejierten Organ ist kein Herzschlag mehr spürbar. Für den adoptiven Transfer wurden alloantigen-spezifische 3-4-fach restimierte T_{VIL-10}-Lymphozyten oder T_{MOCK}-Lymphozyten verwendet, Tag 7-9 nach der letzten Restimulation. Die Zellen waren zu diesem Zeitpunkt ruhend, so dass eine erneute Aktivierung nach dem Antigenkontakt im Tier erfolgen konnte. Die Zellen wurden immer einen Tag vor dem adoptiven Transfer aufgereinigt. Dieses wurde durch einen modifizierten Ficoll-Gradienten erreicht, der es erlaubt, ausschließlich die blastischen Zellen herauszuselektionieren. Für den adoptiven Transfer wurden die Zellen in verschiedenen Zellkonzentrationen in einem Volumen von 500µl PBS in die Penisvene des transplantierten Tieres appliziert.

5.7.1 Untersuchung zur Gewebeverteilung der *ex vivo* generierten T-Lymphozyten in den Organen

In vorangegangenen Arbeiten konnte ein spezifisches Migrationsmuster von T_{EGFP}-Lymphozyten nach adoptivem Transfer in die verschiedenen Organe gezeigt werden (Hammer et al, 2002). Das Einbringen und die Expression eines therapeutischen Moleküls könnte zur Veränderung dieses spezifischen „Homing-Verhaltens“ führen, was wiederum ein verändertes Wirkungsspektrum zur Folge haben könnte. Deshalb wurden alloantigen-spezifische T_{MOCK}-Lymphozyten und T_{VIL-10}-Lymphozyten vor dem adoptiven Transfer mit dem Membranfarbstoff PKH 26 markiert. PKH 26 ist ein Fluoreszenz-Farbstoff zur eindeutigen Detektion von markierten Zellen in Gewebeschnitten. Der adoptive Transfer erfolgte Tag 1 nach der Transplantation (beschrieben in Hammer et al, 2002). Zur Untersuchung der Gewebeverteilung wurden bestimmte Organe (Herz Tx, endogenes Herz, Leber Lunge, Milz)

am Tag 4 nach der Transplantation entnommen und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Detektion der PKH 26 positiven Zellen erfolgte mittels Auszählung im Kryostatschnitt am Lasermikroskop. Im Vergleich zum syngenem Transplantat (Kontrolle) fand eine 3-fach höhere Einwanderung der alloantigen-spezifischen T_{MOCK} -Lymphozyten in das allogene Transplantat statt (Abb.15, A). Die Anzahl der $T_{\text{VIL-10}}$ -Lymphozyten im allogenen Transplantat lag sogar um das 10-fache höher (Abb.15, B). Im Rezipienten-eigenen Herz dagegen wurden bei allen Versuchen nur vereinzelt PKH 26 positive Zellen gefunden. Dieses Ergebnis spiegelt das alloantigen-spezifische „Homing-Verhalten“ wieder, dass in vorangegangenen Versuchen schon mit T_{EGFP} -Lymphozyten untersucht wurde (Hammer et al, 2002). Die Verteilung der PKH 26 positiven T_{MOCK} -Lymphozyten in den Organen Milz und Leber ist vergleichbar mit den Ergebnissen der T_{EGFP} -Lymphozyten. Die $T_{\text{VIL-10}}$ -Lymphozyten dagegen zeigen im Verhältnis eine leicht erhöhte Einwanderung in die Leber und die Milz und eine stark erhöhte in das Lungengewebe. Im Vergleich zur syngenem Kontrolle ist die Einwanderung der $T_{\text{VIL-10}}$ -Lymphozyten in die Lunge um ca. 50% erhöht. T_{MOCK} -Lymphozyten wandern dagegen in gleicher Höhe in das Lungengewebe ein.



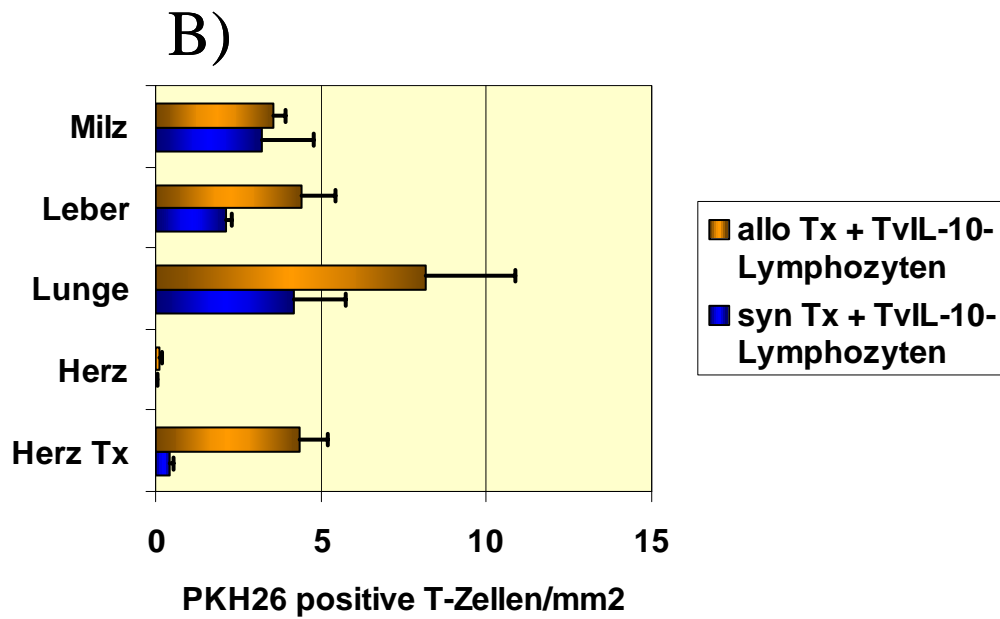


Abbildung 15: Verteilung der PKH 26 markierten alloantigen-spezifischen T-Lymphozyten nach adoptivem Transfer in den Organen. 15×10^6 PKH 26 markierte Zellen wurden am Tag 1 nach der Transplantation i. v. appliziert. Tag 4 nach der Tx wurden die Organe entnommen und $5\mu\text{m}$ Kryostatschnitte angefertigt. Am Lasermikroskop wurden 5 Schnitte mit 250 Gesichtsfeldern ausgezählt (Gesichtsfeld: $0,159\text{mm}^2$). Die Anzahl der PKH 26 markierten Zellen wurde in Zellen/ mm^2 berechnet. A) syngene und allogene Transplantationen mit adoptivem Transfer von T_{MOCK} -Lymphozyten; B) syngene und allogene Transplantationen mit adoptivem Transfer von $T_{\text{vIL-10}}$ -Lymphozyten. ($n=3$).

Interessanterweise fanden sich bei dem Vergleich der absoluten Anzahl der eingewanderten Zellen nur ca. 2/3 der $T_{\text{vIL-10}}$ -Lymphozyten im Vergleich zu den T_{MOCK} -Lymphozyten in allen Organen wieder (Abb.16). Eine leicht erhöhte Einwanderung der $T_{\text{vIL-10}}$ -Lymphozyten in Milz und Leber konnte detektiert werden im Vergleich zu den T_{MOCK} -Lymphozyten bei der allogenen Transplantation. Die Einwanderung in die Lunge ist dagegen um die Hälfte reduziert.

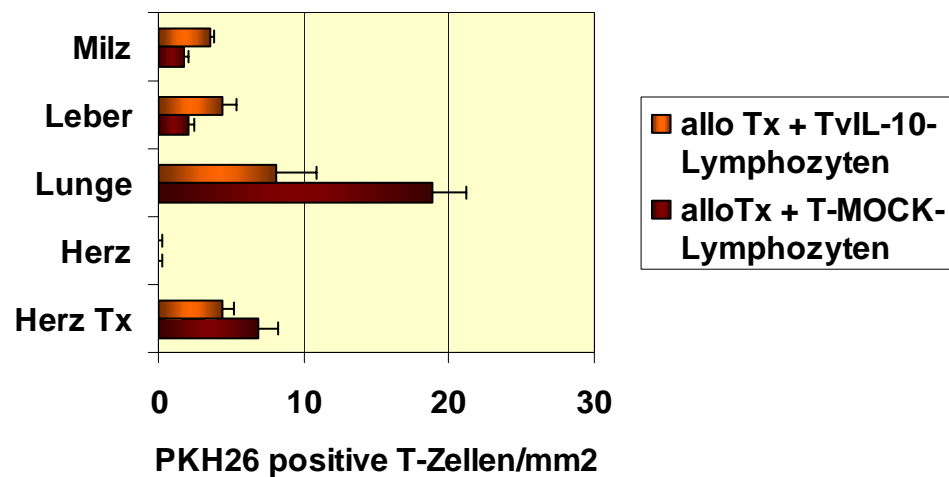


Abbildung 16: Verteilung der PKH 26 markierten alloantigen-spezifischen T_{MOCK} -Lymphozyten mit $T_{\text{vIL-10}}$ -Lymphozyten. 15×10^6 PKH 26 markierte Zellen wurden am Tag 1 nach der Transplantation i. v. appliziert. Tag 4 nach der Tx wurden die Organe entnommen und $5\mu\text{m}$ Kryostatschnitte angefertigt. Am Lasermikroskop wurden 5 Sektionen mit 250 Gesichtsfeldern ausgezählt (Gesichtsfeld: $0,159\text{mm}^2$). Die Anzahl der PKH 26 markierter Zellen wurde in Zellen/mm^2 berechnet ($n = 3$).

Zur weiteren Dokumentation der Ergebnisse wurden Photos von den PKH 26 markierten Zellen in den Schnitten angefertigt. Bei der syngenesischen Transplantation ist nach adoptivem Transfer von T_{MOCK} -Lymphozyten und $T_{\text{vIL-10}}$ -Lymphozyten nur vereinzelt eine markierte Zelle pro Gesichtsfeld zu finden. Bei der allogenen Transplantation ist hingegen, nach dem Transfer von T_{MOCK} -Lymphozyten oder $T_{\text{vIL-10}}$ -Lymphozyten, eine 6-10-fach höhere Zellkonzentration von PKH 26 markierten Zellen zu detektieren (Abb.17).

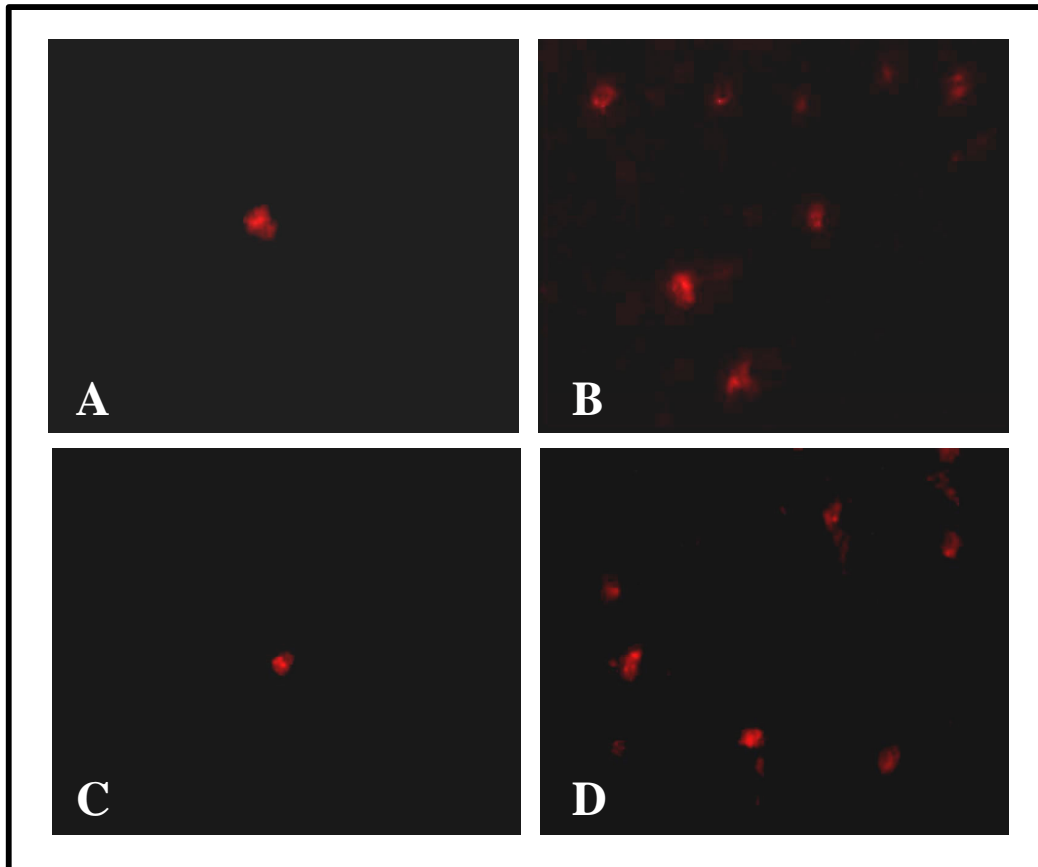


Abbildung 17: Detektion der PKH 26 markierten alloantigen-spezifischen T-Lymphozyten nach adoptivem Transfer im Ratten-Herz-Transplantationsmodell. 15×10^6 PKH 26 markierte Zellen wurden am Tag 1 nach der Transplantation i. v. appliziert. Tag 4 nach der Tx wurden die Organe entnommen, $5\mu\text{m}$ Kryostatschnitte angefertigt und mikroskopisch ausgewertet. In den Abbildungen A-D sind repräsentative Gewebe-Schnitte der transplantierten Organe dargestellt. **A)** syngene Transplantation und adoptiver Transfer von 15×10^6 T_{MOCK} -Lymphozyten; **B)** allogene Transplantation und adoptiver Transfer von 15×10^6 T_{MOCK} -Lymphozyten; **C)** syngene Transplantation und adoptiver Transfer von 15×10^6 $T_{\text{VIL-10}}$ -Lymphozyten; **D)** allogene Transplantation und adoptiver Transfer von 15×10^6 $T_{\text{VIL-10}}$ -Lymphozyten.

5.7.2 Transplantatüberlebenszeiten nach adoptivem T-Zell Transfer

Für den adoptiven Transfer, zur Untersuchung des Einflusses auf die Verhinderung der Transplantatabstoßung, wurden T_{MOCK} -Lymphozyten und $T_{\text{VIL-10}}$ -Lymphozyten in einer Konzentration von 15×10^6 Zellen/500 μl PBS/Tier verwendet. Der Transfer erfolgte in diesem Fall unmittelbar nach der Transplantation. Der Herzschlag des heterotop transplantierten Herzens wurde zwei Mal am Tag kontrolliert. Als Kriterium für eine Transplantatabstoßung wurde der Herzstillstand festgelegt. Das verwendete Transplantationsmodell DA auf Lewis ist ein starkes Abstoßungsmodell und weist einen kompletten „Mismatch“ innerhalb der MHC I

und MHC II Gene auf. Die durchschnittliche Überlebenszeit der Transplantate ohne Behandlung lag bei 6-7 Tagen. Der adoptive Transfer von 15×10^6 alloantigen-spezifischen T_{vIL-10} -Lymphozyten führte zu keiner Verlängerung der Transplantatüberlebenszeit, auch hier lag der Zeitpunkt der Abstoßung zwischen Tag 6-7 (Tab.7). Eine direkte Zytotoxizität der T_{vIL-10} -Lymphozyten konnte ausgeschlossen werden, indem gezeigt werden konnte, dass der Transfer von 15×10^6 transgenen Zellen im syngenem Transplantations-Modell keine Abstoßung zur Folge hatte. Die Transplantate überlebten länger als 30 Tage (Tab.7). Ebenso kam es im allogenen Modell, bei den eingesetzten Zellkonzentrationen von 15×10^6 Zellen, zu keiner akzelerierten Abstoßung des Transplantates. Desweiteren konnte unsere Kooperationsgruppe in Rostock (Lehmann M.) zeigen, dass der adoptive Transfer von 15×10^6 EGFP transgenen Lymphozyten in derselben Stammkombination (Nieren-Transplantation), unter „low-dose“ anti CD4-Behandlung, zu keiner Transplantatabstoßung führt.

Gruppen/Behandlung	Anzahl (n)	allo-Transplantat Überlebenszeit
syn + 15×10^6 T_{vIL-10}-Zellen	3	> 30 Tage
allo unbehandelt	4	6,7,6,6
allo + 15×10^6 T_{vIL-10}-Zellen	4	6,8,6,7
allo + 15×10^6 T_{MOCK}-Lymphozyten	4	6,7,6,6

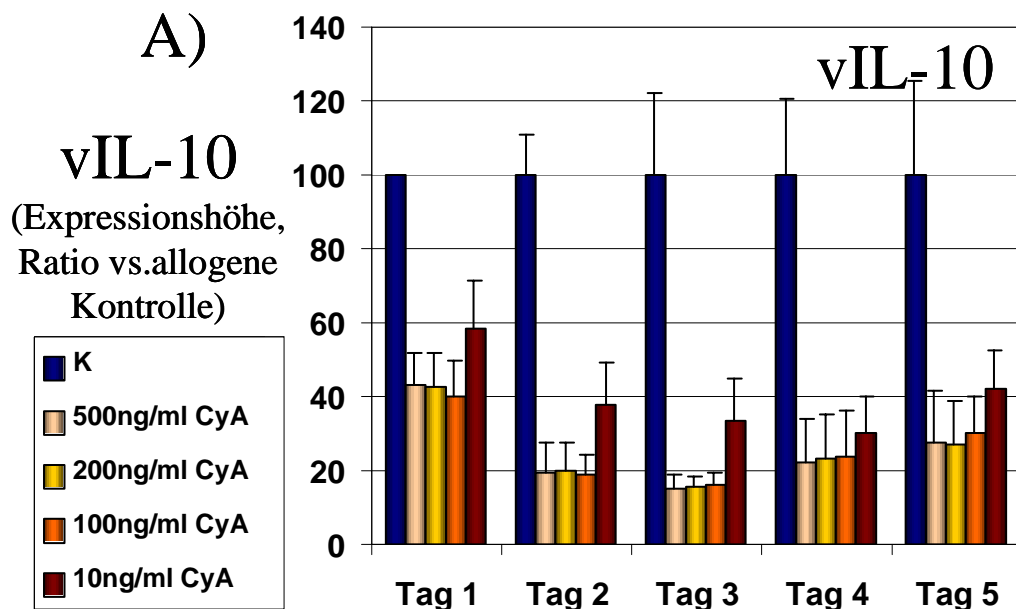
Tabelle 7: Transplantatüberlebenszeiten nach adoptivem Transfer von T_{MOCK} -Lymphozyten und T_{vIL-10} -Lymphozyten. Heterotope Herztransplantation mit sofortiger Applikation von 15×10^6 T_{MOCK} -Lymphozyten oder T_{vIL-10} -Lymphozyten in 500µl PBS in die Penisvene der Ratten. Die Kontrolle des Herzschlages erfolgte zwei Mal am Tag. Das Transplantat wurde bei Ausbleiben des Herzschlages als abgestoßen gewertet.

5.7.3 Auswirkung von Cyclosporin A auf die $vIL-10$ und $IFN-\gamma$ Expression der transgenen Zellen *in vitro*.

Cyclosporin A wird als effektives Immunsuppressivum in der Transplantationsmedizin eingesetzt. Die Wirkung wird hauptsächlich durch die Inhibierung von NFκB und die daraus resultierende verminderte Expression der Zytokingene (IL-2, $IFN-\gamma$) vermittelt. Die Applikation einer geringen, suboptimalen Dosis Cy A (0,5mg/kg/Tag) führt nicht zu einer Verlängerung der Transplantat-Überlebenszeit im Modell DA-Lewis. Die Kombination einer geringen Dosis Cy A mit dem adoptivem Transfer von T_{vIL-10} -Lymphozyten könnte den

transgenen Zellen eine größere Chance geben, ihr immunmodulatorisches Potential zu entfalten. So besteht die Möglichkeit, dass eine suboptimale Dosis Cyclosporin A einerseits die Proliferation und IFN- γ Produktion der Rezipienten T-Zellen inhibiert, andererseits aber die regulative Wirkung, vermittelt über die T_{vIL-10}-Lymphozyten, zulässt. Ein wichtiger Aspekt bei dieser Hypothese ist die Frage, ob die vIL-10 Expression ebenso durch Cyclosporin A inhibiert wird. Da vIL-10 Expression über den retroviralen LTR-Promoter kontrolliert wird, sind wir davon ausgegangen, dass die vIL-10 Expression nur geringfügig inhibiert wird.

Um diese Hypothese zu untersuchen wurde zunächst die inhibitorische Wirkung von unterschiedlichen Dosen Cy A (500ng/ml, 200ng/ml, 100ng/ml, 10ng/ml) auf die Transgen-Expression und IFN- γ Produktion der T_{vIL-10}-Lymphozyten *in vitro* untersucht. T_{vIL-10}-Lymphozyten wurden restimuliert unter Anwesenheit unterschiedlicher Cy A Konzentrationen. Die Zellkulturüberstände wurden zwischen Tag 1-5 auf ihren vIL-10 und IFN- γ Gehalt mittels ELISA analysiert. Die Transgen-Expression wird 2-5 fach dosisabhängig durch Cy A inhibiert (Abb.18A). Die IFN- γ Expression dagegen wird dosisabhängig 8-100 fach reduziert (Abb.18B).



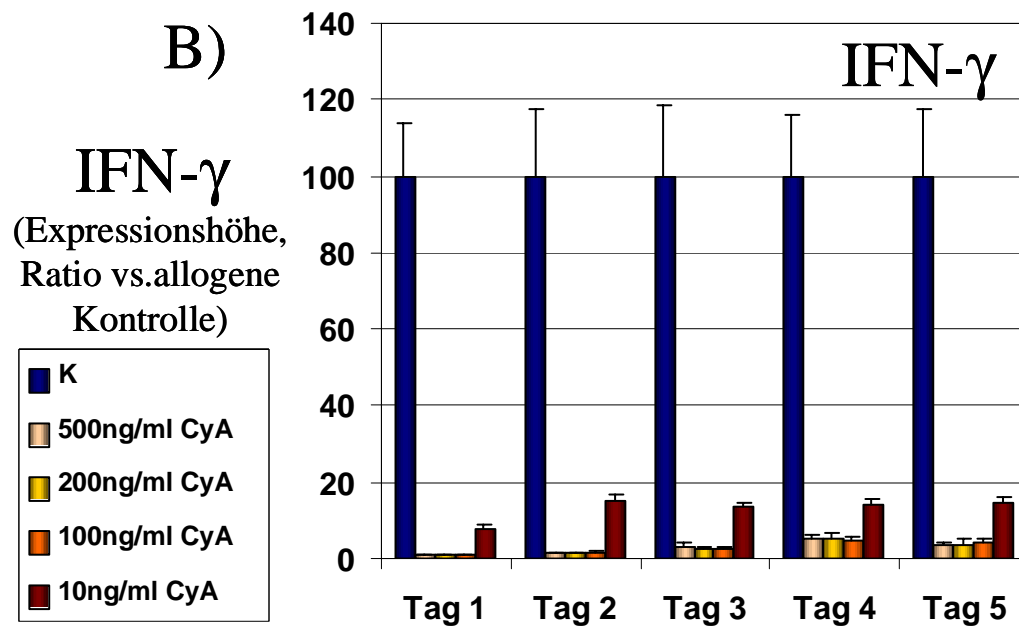


Abbildung 18: Dosis-Wirkungskurve von Cyclosporin A auf die vIL-10 und IFN- γ Expression von T_{vIL-10}-Lymphozyten *in vitro*. 1×10^5 T_{vIL-10}-Lymphozyten wurden mit je 3×10^5 bestrahlten LE und DA Thymozyten unter Anwesenheit von 500ng/ml, 200ng/ml, 100ng/ml, 10ng/ml und 0ng/ml Cyclosporin A restimuliert. Tag 1-5 wurden die Zellkulturüberstände auf die vIL-10 (**A**) und IFN- γ Expression (**B**) analysiert. Die Expressionshöhe der Zytokine ist als Ratio versus allogener, nicht mit Cy A behandelter Kontrolle, dargestellt (n = 5).

5.7.4 Kombinationstherapie von Cyclosporin A und adoptivem Transfer von T_{vIL-10}-Lymphozyten *in vivo*.

Bei der Kombinationstherapie wurden die Empfänger-Ratten vom Tag vor der Transplantation an mit 0,5mg/kg/Tag Cyclosporin A s.c. behandelt. Die Transplantation und der adoptive Transfer wurde nach demselben Ablauf wie in den vorangegangenen Versuchen durchgeführt. Auch die Kombinationstherapie von Cy A mit 15×10^6 bzw. 3×10^6 transgenen Zellen führte zu keiner Verlängerung der Transplantatüberlebenszeit (Tab.8). Die geringer dosierte Applikationsform von 3×10^6 Zellen wurde gewählt, da die Expressionshöhe der T_{vIL-10}-Lymphozyten *in vitro* sehr hoch ist, so dass die Möglichkeit besteht, dass bereits eine kleinere Menge der T_{vIL-10}-Lymphozyten zur Immunmodulation ausreicht.

Gruppen/Behandlung	Anzahl (n)	Allo-Transplantat Überlebenszeit
allo + Cyclosporin A	4	7,7,7,7
allo + Cyclosporin A + 15×10^6 T _{vIL-10} -Zellen	4	6,7,6,7
allo + Cyclosporin A + 3×10^6 T _{vIL-10} -Zellen	4	7,6,7,6

Tabelle 8: Transplantatüberlebenszeiten bei der Kombinationstherapie von Cy A mit T_{vIL-10}-Lymphozyten. Beginnend am Tag –1 wurden die Empfänger Tiere mit 0,5mg/kg/Tag Cyclosporin A behandelt. Am Tag 0 wurde die heterotope Herztransplantation mit anschließendem adoptivem Transfer von 3×10^6 bzw. 15×10^6 T_{vIL-10}-Lymphozyten in die Penisvene durchgeführt. Die Kontrolle des Herzschlages erfolgte zwei Mal am Tag. Das Transplantat wurde bei Ausbleiben des Herzschlages als abgestoßen gewertet.

6 Diskussion

Bei den akuten Abstoßungsprozessen in der Transplantation spielen CD4⁺-Lymphozyten eine Schlüsselrolle. Die Inhibierung ihrer Aktivierung stellt eine Möglichkeit dar, initial in den Abstoßungsprozess einzugreifen. Dieses kann erreicht werden durch den Einsatz einer konventionellen, lebenslangen Immunsuppression, die jedoch fast immer zu gravierenden Nebenwirkungen führt und außerdem die chronische Transplantatabstoßung nicht verhindert. Ziel der modernen gentherapeutischen Forschung ist es, mit einer Kurzzeittherapie die lebenslange Akzeptanz eines fremden Organs ohne langanhaltende Schädigung der generellen Immunantwort zu erreichen. Ein mögliches Modell in der Gentherapie ist die Expression therapeutischer Gene im Transplantat mittels adenoviralem Gentransfer. Die Nachteile liegen bei der zeitlich begrenzten (transienten) Expression des Transgens und bei der ausschließlich auf das Transplantat begrenzten Expression. Ein anderer Ansatz zur Inhibierung der CD4⁺-Lymphozyten bietet der stabile retrovirale Gentransfer direkt in Zellen des Immunsystems (T-Zellen, DCs). Eine alloantigen-spezifische *ex vivo* Prägung der transgenen Zellen führt außerdem zu einem allo-spezifischen Homing-Verhalten der Zellen in das Transplantat und die sekundären lymphatischen Organe *in vivo*. In der vorliegenden Arbeit ist das Potential von alloantigen-spezifischen und für vIL-10 transgenen T-Lymphozyten, immunmodulatorisch und immunsuppressiv auf die Immunantwort bei der allogenen Transplantation einzuwirken, untersucht worden.

Dazu wurde als erstes mit Hilfe einer retroviralen Verpackungszelllinie ein Retrovirus, das das vIL-10 Gen exprimiert, generiert. Das hergestellte vIL-10 Molekül wurde hinsichtlich seiner biologischen Aktivität getestet. Es konnte gezeigt werden, dass vIL-10 haltige Zellkulturüberstände die LPS induzierte TNF- α Freisetzung in PBMC, vergleichbar mit rekombinantem IL-10, inhibieren (Abb.8). Der virale Titer der Verpackungszelllinie liegt bei $3-5 \times 10^6$ cfu/ml (Tab.4). Die retrovirale Transduktion der naiven T-Lymphozyten erfolgte mittels Ko-Kultivierung der Verpackungszelllinie bei gleichzeitiger allogener Stimulation der T-Zellen. Die Transduktionseffizienz nach der Ko-Kultivierung liegt bei ca. 10-20% der T-Lymphozyten. Über mehrere Restimulations- und Selektionsschritte wurde eine alloantigen-spezifische und für vIL-10 transgene T-Zelllinie generiert. Es konnte gezeigt werden, dass die T_{vIL-10}-Lymphozyten sowohl die Proliferation als auch die IFN- γ Produktion von naiven T-Lymphozyten bei gleichzeitiger allogener Stimulation *in vitro* signifikant inhibieren (Abb.

12,14). Der adoptive Transfer dieser allo-spezifischen T_{VIL-10}-Lymphozyten führte jedoch in den bisherigen Untersuchungen, allein und in einer Kombinationstherapie mit Cyclosporin A (suboptimale Dosis), zu keiner Verlängerung der Transplantatüberlebenszeit im Herz-Transplantationsmodell der Ratte (Tab.7,8).

6.1 T-Lymphozyten als Zielzellen für die Genexpression in das Transplantat

Das Problem vieler Arbeiten zum Gentransfer ist immer noch die optimale Applikation des therapeutischen Moleküls. So führt die systemische Gabe eines Zytokins selten zu einem lokales Milieu, welches der physiologischen Situation entspricht. Außerdem haben Zytokine im Serum eine sehr kurze Halbwertszeit, so dass das therapeutische Protein ständig nachgeliefert werden müsste, um den gewünschten Serumspiegel zu erreichen. Die systemische Gabe von Zytokinen kann zudem zu unerwünschten Nebenwirkungen führen. In vorangegangenen Studien wurde bereits das enorme Potential von T-Zellen als Transportvehikel für therapeutische Moleküle dargestellt. Dieses erfolgte am Beispiel des Reportergens EGFP. Die Ergebnisse können wie folgt zusammengefasst werden:

- 1) Die alloantigen-spezifische Aktivierung retroviral transduzierter T-Zellen führt *in vitro* und *in vivo* zu einer gesteigerten Transgenexpression, die durch die Kombination einer gesteigerten Zahl transduzierter Lymphozyten und die verstärkte Expression in der einzelnen Zelle hervorgerufen wird (Hammer et al, 2000).
- 2) Die Migration der alloantigen-spezifischen Zellen nach adoptiven Transfer erfolgt spezifisch (unabhängig vom Wirkungsmechanismus) in das allogene Transplantat. Außerdem rezirkulieren die transgenen Zellen durch die sekundären lymphatischen Organe, die Orte, an denen unter anderen die T-Zellaktivierung über APCs stattfindet (Hammer et al, 2002).

Des weiteren sind T-Lymphozyten unproblematisch zu isolieren und kultivieren und weisen eine lange natürliche Lebensdauer auf. Auf Grund dieser Tatsachen und Ergebnisse sind T-Lymphozyten außergewöhnlich gut als Transportvehikel für therapeutische Moleküle geeignet.

Neben der Anwendung von T-Zellen sind auch dendritische Zellen sehr gut für einen gentherapeutischen Ansatz geeignet, da sie ebenfalls ausschlaggebend an der Initiation und

Regulation der Immunantwort beteiligt sind. Neuere Untersuchungen haben Erkenntnisse zur Entwicklung, Reifung, Aktivierung und Funktion von DCs beigetragen. Es existieren unterschiedliche Subtypen dieser Zellen, die in Abhängigkeit ihrer Zytokinexpression und Oberflächenmoleküle polarisierend zu einer Th1 oder Th2 Immunantwort führen und die Entstehung regulatorischer T-Zellen induzieren können. Viele Untersuchungen weisen daraufhin, dass DCs eine große Rolle bei der Entwicklung einer zentralen als auch peripheren Toleranz spielen. Aus diesen Gründen stellt die genetische Manipulation, z.B. durch die Überexpression anti-inflammatorischer Moleküle (IL-10, TGF- β) eine weitere Möglichkeit dar, immunmodulatorische auf die allogene Immunantwort einzuwirken. Es konnte gezeigt werden, dass der retrovirale Gentransfer von vIL-10 in dendritische Vorläuferzellen zu der Entstehung von potentiell toleranten APCs führt (Takayama et al, 1999).

6.2 Generierung vIL-10 produzierender T-Zellen

Regulatorische T-Zellen spielen bei der Induktion und Erhaltung einer Toleranz eine wichtige Rolle. Eine *in vitro* Generierung dieser T-Zellen wäre daher von enormen Interesse. Diese gestaltet sich aber, abgesehen von einigen Berichten über IL-10 generierte regulatorische T-Zellen, als sehr schwierig (Groux et al, 1997). Es ist bisher auch nicht gelungen, *in vivo* generierte, regulatorische Zellen längere Zeit in Kultur zu halten oder gar zu vermehren. Es schien daher ein sinnvoller Ansatz zu sein, regulatorische T-Zellen durch gezielte Überexpression von therapeutischen Molekülen *in vitro* zu generieren und auf ihr regulatorisches Potential zu untersuchen.

Zur Herstellung einer alloantigen-spezifischen und für das anti-inflammatorische Molekül vIL-10 transgenen T-Zelllinie wurde ein retrovirales Transduktionssystem verwendet. Die Transduktionseffizienz nach Ko-Kultivierung der MLC mit der Verpackungszelllinie über drei Tage liegt bei nur durchschnittlich 10-20%, so dass anschließende Restimulationen unter gleichzeitiger Antibiotikaselektion notwendig sind. Die Selektion ist möglich durch das auf dem retroviralen Plasmid integrierte Neomycin-Gen. Die Restimulationen ermöglichen die Herstellung einer nahezu 100%igen Population von alloantigen-spezifischen und für vIL-10 transgenen T-Zellen. Nachteilig ist der große Zeitaufwand, der benötigt wird, um eine ausreichend große Population der T_{vIL-10}-Lymphozyten für die *in vivo* Applikationen zu generieren. Des weiteren kann bei der Umsetzung der T-Lymphozyten nach Ko-Kultivierung mit der Verpackungszelllinie eine Kontamination der T-Zellen mit der adhären

virusproduzierenden Zelllinie auftreten. Da diese ebenfalls über das Resistenzgen verfügt, ist eine Abtrennung über Antibiotikaselektion nicht möglich. Die Ko-Kultivierung selbst ist notwendig, da die viralen Titer der retroviren Verpackungszelllinien relativ gering sind (im Vergleich zu adenoviralen Titern). Viele Untersuchungen deuten daraufhin, dass die Transduktionseffizienz in eine Zielzelle unter anderen im direkten Zusammenhang mit der Titerhöhe steht. Um so höher der Titer, um so größer ist die Effizienz. Die in unserem System verwendeten Titer lagen zwischen 3×10^6 - 3×10^7 cfu/ml (Tab.4). Im Vergleich dazu liegen die adenoviralen Titer bei über 1×10^{10} pfu/ml, nach Aufkonzentrierung des Virus. Eine Anreicherung der Retroviren mittels Ultrazentrifugation ist auf Grund der instabilen Virushülle nicht möglich. Die einzige Möglichkeit bisher, indirekt einen höheren Titer zu erreichen ist die Kokultivierung über einen längeren Zeitraum von drei Tagen, wie in unserem System angewendet. Weiter scheinen Zell-Zell-Kontakte ebenfalls eine Rolle bei der Virusaufnahme zu spielen. In den letzten Jahren wurden Methoden entwickelt, die mit Hilfe von Filtern verschiedener Größe eine schonende Aufkonzentrierung der Retroviren mittels Zentrifugation erlauben. Erste Ergebnisse sind sehr vielversprechend hinsichtlich der Titererhöhung bei gleichzeitigem geringen Virusverlust. Ziel der Weiterentwicklung der retroviren Transduktionssysteme liegt darin, einen Virusstock mit einem sehr hohen Titer zu generieren, wodurch eine Ko-Kultivierung vermieden werden kann. Weitere Arbeiten zum Gentransfer mit Virusüberstand im Hinblick auf eine Humananwendung sind geplant.

6.3 Einfluss von vIL-10 auf die transduzierte Zelllinie

Die retroviral transduzierten T-Zelllinien (T_{vIL-10} -Lymphozyten, T_{EGFP} -Lymphozyten, T_{MOCK} -Lymphozyten) wurden nach ihrer Generierung ausführlich charakterisiert. Sowohl auf Protein-Ebene, mRNA-Ebene und mittels FACS-Analyse wurde eine hohe IFN- γ Expression und auf Proteinebene keine IL-4 Expression detektiert (Tab.5,6). Dieses entspricht dem Phänotyp von Th1-Zellen. Aber auch in regulatorischen Zellen konnte eine IFN- γ Expression nachgewiesen werden. T_{vIL-10} -Lymphozyten zeigen keine signifikanten Unterschiede auf Protein und mRNA-Ebene im Vergleich zu T_{EGFP} -Lymphozyten und T_{MOCK} -Lymphozyten. Zum einen deutet dieses daraufhin, dass durch die retrovirale Transduktion keine einschneidenden Veränderungen in den T-Zellen hervorgerufen wurden, welches ein wichtiges Kriterium bei der Verwendung viraler Transduktionssysteme ist. Andererseits wurde der Th1- Phänotyp, der schon in T_{EGFP} -Lymphozyten beschrieben wurde, nicht durch die Überexpression von vIL-10

verändert (Hammer et al, 2002). IL-10 spielt eine große Rolle bei der Regulation der Entwicklung einer Th1- und Th2-Immunantwort. Der exakte Regulationsmechanismus wird jedoch in der Literatur kontrovers diskutiert. Vor kurzem konnte gezeigt werden, dass der immunsuppressive Effekt von vIL-10 im direkten Zusammenhang mit dem Vorhandensein von Th2-Zytokinen, z.B. IL-4 und IL-10 steht (Qin et al, 2001). Andererseits führt der lokale Gentransfer von IL-10 nicht zur Verlängerung der Transplantatüberlebenszeit, und in einem syngenem Tumor-Modell sogar zur Tumorabstoßung (Qin et al, 1996; Suzuki et al, 1995). In vielen Modellen konnte jedoch gezeigt werden, dass eine Toleranzinduktion in Korrelation mit einer erhöhten Sekretion von Th2-Zytokinen steht (Takeuchi et al, 1992; Sayegh et al, 1995). Da auch vIL-10 bei den anti-inflammatorischen Zytokinen eingeordnet wird und IL-10 auch schon im Zusammenhang mit regulatorischen T-Zellen diskutiert wird, liegt der Schluss nahe, dass die Gegenwart von vIL-10 schon bei der ersten allogenen Stimulation, und die anschließende Überexpression von vIL-10 in den T-Zellen selbst, zu einer Veränderung des Phänotyps der Zellen führen würde. Eine Veränderung des Phänotyps der generierten T_{vIL-10}-Lymphozyten von Th1 in Richtung Th2 konnte jedoch nicht festgestellt werden. Die IFN- γ Expression auf Protein-Ebene lag zwar geringfügig unter der von den T_{MOCK}-Lymphozyten und T_{EGFP}-Lymphozyten, aber dennoch wurden Konzentrationen zwischen 1-5 ng/ml IFN- γ erreicht. Anti-apoptotische Gene, wie Bcl-2 oder Bag1 wurden von allen Zelllinien auf mRNA-Ebene sehr viel stärker als der apoptotische Marker FasL oder INOS exprimiert. Auch der Aktivierungsmarker CD25 (α -Kette des IL-2 Rezeptors) konnte aktivierungsabhängig auf allen T-Zelllinien nachgewiesen werden. Trotz des Th1 Phänotyps der transgenen T-Zelllinie ist nicht auszuschließen, dass Subpopulationen in der Zelllinie enthalten sind, die zusätzlich zu der vIL-10 Überexpression regulativ wirken können. Somit besteht die Möglichkeit, dass die T_{vIL-10}-Lymphozyten über zwei verschiedene Wirkungsmechanismen in den Rejektionsprozess eingreifen können. Zum einen über die Sekretion des antiinflammatorischen und immunmodulatorischen Moleküls vIL-10, zum anderen über regulativ wirkende T-Zell-Subpopulationen der T-Zelllinie.

6.4 Wirkung und Wirkungsmechanismen der T_{vIL-10}-Lymphozyten *in vitro*

Die Funktionsanalysen der T_{vIL-10}-Lymphozyten *in vitro* zeigen deutlich das immunmodulatorische Potenzial der für vIL-10 transgenen T-Zelllinie. Die Proliferation und die IFN- γ Produktion von naiven T-Zellen konnte, bei gleichzeitiger allogener Stimulation,

signifikant inhibiert werden (Abb.12,14). In der gemischten Lymphozyten-Kultur (MLC) kann die Aktivierung der naiven „responder“ T-Zellen über zwei Wege vermittelt werden. Bei der direkten Antigenpräsentation werden die Alloantigene von den Stimulator-APCs direkt präsentiert. Bei der indirekten Antigenpräsentation werden die Spenderantigene zunächst von den „responder“ APCs phagozytiert und anschließend über MHC II den eigenen T-Lymphozyten präsentiert. Beide Aktivierungswege können gleichzeitig ablaufen, wobei die direkte Aktivierung schneller greift als die indirekte und somit den vorherrschenden Mechanismus der Antigenpräsentation in einer MLC widerspiegelt. Das Modell der MLC ist eine stark vereinfachte Darstellung einer Situation, wie sie bei der allogenen Transplantation *in vivo* vorliegt. Auch hier scheinen die Spender-APCs eine wichtige Rolle bei der Entscheidung zwischen Toleranz und Rejektion zu spielen (Sekine et al, 1997; Josien et al, 1998). Der Wirkungsmechanismus von vIL-10, der zur Inhibierung der Proliferation und auch IFN- γ Produktion der naiven T-Zellen führt, kann ebenso über verschiedene Ebenen vermittelt werden. Zum einen durch die Inhibierung der „responder“-APCs und zum anderen durch die Inhibierung der direkten Antigenpräsentation mittels Spender-APCs. Interessanterweise führt die Kokultivierung von EGFP transgenen T-Lymphozyten zu einer Verstärkung der Proliferation und auch IFN- γ Produktion in den naiven T-Zellen (Abb.12). Die Ursache hierfür ist nicht klar, es könnte jedoch sein, dass die Alloreaktivität der T_{EGFP}-Lymphozyten und die damit verbundene hohe IFN- γ und auch IL-2 Produktion zu einer schnelleren Aktivierung der naiven T-Zellen führt als im allogenen Kontrollansatz ohne transgene Zellen. Die Aktivierung erfolgt wahrscheinlich über die direkte Antigenpräsentation durch die Spender APCs und wird zusätzlich unterstützt durch die sofortige Sekretion von IL-2 durch die T_{EGFP}-Lymphozyten. Die T_{vIL-10}-Lymphozyten konnten trotz des Th1 Phänotyps und der hohen IFN- γ Produktion inhibitorisch wirken (Abb.12,13,14). Dieser Effekt wird am wahrscheinlichsten über die Inhibierung von kostimulatorischen Molekülen auf „responder“ und Spender APCs vermittelt (Bejarano et al, 1992). Eine direkte inhibitorische Wirkung von vIL-10 auf den B7 Rezeptor CD28 oder CTLA-4 von T-Zellen wurde ebenfalls beschrieben (Schonrich et al, 1998). Andere Gruppen beschreiben ähnliche Effekte von IL-10. So führt die Aktivierung von T-Zellen in Gegenwart von IL-10 zur Anergie der Zellen, die weder durch IL-2, noch durch Stimulation von anti-CD3 und anti-CD28 revertierbar ist (Groux et al, 1996). Weiter wird die über IL-10 vermittelte Anergie assoziiert mit der Induktion von regulatorischen T-Zell-Populationen. Diese produzieren hohe Konzentrationen an IL-10 und supprimieren effektiv die

antigen-spezifische Immunantwort *in vitro* und *in vivo* (Asseman et al, 1999). Mit Hilfe der T_{vIL-10}-Lymphozyten konnte das erste Mal *in vitro* gezeigt werden, dass nach retroviraler Transduktion von naiven T-Zellen mit dem anti-inflammatorischen Molekül vIL-10, diese wirkungsvoll einen inhibitorischen Einfluss auf die allogenen T-Zell-Aktivierung vorweisen.

6.5 Wirkung der T_{vIL-10}-Lymphozyten *in vivo*

6.5.1 Adoptiver Transfer im Herztransplantationsmodell

Aufgrund der im Kapitel 6.5. beschriebenen Resultate und der Ergebnisse der *in vitro* Studien mit den T_{vIL-10}-Lymphozyten sind wir von der Hypothese ausgegangen, dass eine lokale alloantigen-spezifische Sekretion des anti-inflammatorischen Moleküls vIL-10 über die retroviral modifizierten T-Lymphozyten erfolgt. Als Transplantationsmodell wurde die Übertragung des Herzens von DA-Ratten auf Lewis-Ratten gewählt, also eine donorspezifische Transplantation in gleicher Stammkombination wie bei der Generierung der transgenen alloantigen-spezifischen T-Lymphozyten. Die beiden Rattenstämme weisen einen kompletten Mismatch in den Genloci MHC I und MHC II auf. Die durchschnittliche Transplantatüberlebenszeit in diesem starken Abstoßungsmodell liegt zwischen Tag 6-8. Der adoptive Transfer von $1,5 \times 10^7$ transgenen Zellen erfolgte sofort im Anschluss an die Transplantation in die Penisvene des Tieres. Es konnte keine Verlängerung der Transplantatüberlebenszeit nach adoptivem Transfer von $1,5 \times 10^7$ T_{vIL-10}-Lymphozyten nachgewiesen werden (Tab.7). Die Herzen wurden zwischen Tag 6-7 abgestoßen. Die Überexpression des anti-inflammatorischen Moleküls könnte es zu einem veränderten Migrationsverhalten der transgenen Zellen führen. Um dieses zu untersuchen, wurden sowohl T_{MOCK}-Lymphozyten als auch T_{vIL-10}-Lymphozyten vor dem adoptivem Transfer mit dem Fluoreszenzfarbstoff PKH 26 markiert. Am Tag 4 nach der Transplantation wurden die Organe entnommen und mit Hilfe von Gewebeschnitten die Anzahl der PKH 26 markierten Zellen bestimmt. Es konnte ein alloantigen-spezifisches Migrationverhalten der T_{vIL-10}-Lymphozyten nachgewiesen werden (Abb.15,16). Die Ergebnisse sind hinsichtlich der Allospezifität vergleichbar mit den Migrationsstudien der T_{EGFP}-Lymphozyten. Im Vergleich der T_{MOCK}-Lymphozyten mit den T_{vIL-10}-Lymphozyten wird deutlich, dass die Gesamtanzahl der zu detektierenden markierten T_{vIL-10}-Lymphozyten reduziert ist. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass die Zellen vermehrt apoptotisch sind. Die mRNA-Untersuchungen der apoptotischen Marker FasL und INOS sind zwar nicht erhöht, es besteht jedoch die

Möglichkeit, dass die hohe IFN- γ Produktion der T_{vIL-10}-Lymphozyten zur Aktivierung des Immunsystems führt, welches den Tod der Zellen zur Folge hat. Ebenso besteht die Möglichkeit, dass die T_{vIL-10}-Lymphozyten auf dem Weg in das Transplantat „versickern“, was erklären würde, dass lediglich 2/3 der ursprünglich applizierten T_{vIL-10}-Lymphozyten im Vergleich zu den T_{MOCK}-Lymphozyten im Gewebe wiederzufinden sind (Abb.16). Unklar ist bislang, wie hoch die vIL-10 Konzentrationen *in vivo* im Transplantat und den sekundären lymphatischen Organen sind. Dieses ist Gegenstand weiterer Untersuchungen. Viele Ergebnisse deuten darauf hin, dass IL-10 und vIL-10 dosis-abhängig wirken. Die systemische Applikation von IL-10 und eine lokale hohe Konzentration führt in einigen Transplantationsmodellen zu einer akzelerierten Abstoßung (Qian et al, 1996; Li et al, 1997). Der retrovirale Gentransfer von vIL-10 im Herztransplantationsmodell hingegen zeigt eine vielversprechende Überlebenszeitverlängerung des Transplantates (Qin et al, 1996; Zuo et al, 2001). Ebenso wurde beschrieben, dass hohe Konzentrationen von IL-10 assoziiert sind mit der Ausbildung einer Toleranz gegen allogene Stammzellen des Knochenmarks (Bacchetta et al, 1994). Diese Ergebnisse deuten klar daraufhin, dass die Wirkung von IL-10 und auch vIL-10 dosisabhängig ist (Blazar et al, 1998). Eine exakte Regulierung der Expressionshöhe ist jedoch nach retroviralen Gentransfer nicht möglich. Es besteht auch die Möglichkeit, dass die Expression des therapeutischen Gens zu hoch ist und dadurch ein gegenteiliger Effekt erzielt wird. Aus diesem Grund wurde eine geringer dosierte Applikation der T_{vIL-10}-Lymphozyten (3×10^6 T-Zellen) getestet, die jedoch ebenfalls zu keiner Verlängerung der Transplantatüberlebenszeit führte (Tab.8).

6.5.2 Kombinationstherapie: Cy A und T_{vIL-10}-Lymphozyten

Das gewählte Transplantationsmodell DA auf Lewis ist, wie schon erwähnt, ein sehr starkes Abstoßungsmodell. Deshalb haben wir zur Unterstützung der T_{vIL-10}-Lymphozyten eine Kombinationstherapie mit Cyclosporin A gewählt. Cyclosporin A wirkt als Calcineurininhibitor und wird bei humanen Transplantationen als wirkungsvolles Immunsuppressivum eingesetzt, so dass es zu keiner akuten Abstoßungsreaktion kommt. Die Applikation einer geringen, suboptimalen Dosis Cy A („low dose“ 0,5mg/kg/Tag entspricht ca. 200ng im Serum) führt in diesem Modell nicht zur Verhinderung der Rejektion, inhibiert aber das Immunsystem dahingehend, dass möglicherweise regulatorische T-Zellen entstehen können, bzw. die T_{vIL-10}-Lymphozyten ihr immunmodulatorischen Potenzial entfalten können. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass die Gabe von einer mittelhohen, nicht-

therapeutisch wirksamen Cy A Konzentration (1,5mg/kg/Tag) zur Toleranzinduktion in einigen Transplantationsmodellen führt (pers. Mitteilung H.-D. Volk). Es ist vorstellbar, dass die geringe Cy A Konzentration die allogene Immunantwort stark genug inhibiert, dass die Transplantatabstoßung zunächst verhindert wird, aber gleichzeitig das Immunsystem noch ausreichend aktiviert ist, um die Generierung regulatorisch wirkender T-Zellen zuzulassen. Die Applikation von Cyclosporin A führt über die Inhibierung von NFκB zu einer verminderten Zytokinsynthese (IL-2, IFN-γ), was wiederum eine Inhibierung der allogenen Immunantwort zur Folge hat. Wir sind von der Hypothese ausgegangen, dass die Applikation von Cy A folgendes bewirkt:

- 1) Hemmung der Proliferation der Rezipienten T-Zellen.
- 2) Hemmung der IFN-γ Synthese in den Rezipienten und vIL-10 transgenen Zellen.

Des weiteren wird das therapeutische Transgen vIL-10 über den retroviralen LTR-Promoter transkribiert, von dem zwar bekannt ist, dass Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren NFAT, NFκB und AP-1 vorhanden sind, welcher jedoch auch große Unterschiede im Vergleich zu humanen Promotern aufweist (Hammer et al, 2000). Dadurch könnte die über den LTR-Promoter vermittelte vIL-10 Transkription nur geringfügig von Cy A inhibiert werden. Zunächst wurde diese Hypothese *in vitro* untersucht. T_{vIL-10}-Lymphozyten wurden restimuliert in der Gegenwart von verschiedenen Cy A-Konzentrationen. Anschließend wurden die Zellkulturüberstände am Tag 1 bis 5 auf ihre IFN-γ und vIL-10 Konzentrationen im ELISA getestet. Es konnte eindeutig gezeigt werden, dass die IFN-γ Sekretion bei einer Konzentration von 200ng/ml Cy A 20-30fach inhibiert wurde (Abb.18B). vIL-10 dagegen wurde nur um das 4-5 fache inhibiert (Abb.18A). Die Expressionshöhe des Transgens und die T-Zell-Aktivierung stehen im direkten Zusammenhang. Folglich hat die Applikation von Cy A indirekt auch einen Einfluss auf die Expressionshöhe des Transgens der T_{vIL-10}-Lymphozyten. Während die IFN-γ Expression jedoch fast vollständig inhibiert wird, kann vIL-10 noch in einer therapeutisch relevanten Dosis sekretiert werden, so dass diese Kombinationstherapie *in vivo* zur Verlängerung der Transplantatüberlebenszeit - vermittelt über die transgenen T-Lymphozyten - führen könnte. Die Transplantationen wurden wie schon beschrieben durchgeführt. Mit der Cy A Therapie wurde einen Tag vor der Transplantation mit einer subcutanen Injektion von 0,5mg/kg/Tag begonnen. Der adoptive Transfer von 15×10^6 oder 3×10^6 T_{vIL-10}-Lymphozyten erfolgte im sofortigen Anschluss an die Transplantation. Auch die

Kombinationstherapie führte zu keiner Verlängerung der Transplantatüberlebenszeit. Die Abstoßung der allogenen Transplantate erfolgte am Tag 7 (Tab.8).

Das Ausbleiben einer immuninhibitorischen oder immunmodulatorischen Wirkung der T_{vIL-10}-Lymphozyten im allogenen Transplantationsmodell kann unterschiedliche Ursachen haben:

6.5.3 Problematik von Dosis und Wirkung von vIL-10.

Nach den bisherigen Erkenntnissen ist nicht bekannt, wie viel bioaktives vIL-10 von den transgenen T-Lymphozyten nach dem adoptiven Transfer *in vivo* exprimiert wird. Auf Grund der vorangegangenen Studien mit EGFP als Reportergen können wir davon ausgehen, dass die Sekretion spezifisch im Allotransplantat und den sekundären lymphatischen Organen erfolgt. EGFP wird in der Zelle akkumuliert, so dass keine direkten Vergleiche mit der Sekretion eines therapeutischen Moleküls gezogen werden können. Es besteht die Möglichkeit, dass die sekretierte Menge an vIL-10 zu gering oder zu hoch ist. Auch die Expression des IL-10-Rezeptors auf den verschiedenen Zellen des Gewebes und der Immunzellen ist im direkten Zusammenhang mit der Wirkung von vIL-10 auf die Regulation der allogenen Immunantwort zu sehen (Ding et al, 2001). Weitere Experimente müssen folgen, um zu untersuchen in welcher Höhe vIL-10 nach dem adoptiven Transfer im allogenen Transplantat, den sekundären lymphatischen Organen und anderen Geweben exprimiert wird. Ebenso Untersuchungen zur Expression des IL-10-Rezeptors. Diese Ergebnisse würden wichtige Informationen zur Aufklärung von Dosis und Wirkung des anti-inflammatorischen Moleküls vIL-10 in der Regulation der allogenen Immunantwort liefern.

6.5.4. Zeitliche Applikation und Wirkungsmechanismus von vIL-10.

Ein weiteres essentielles Problem beim adoptiven Transfer ist der Zeitpunkt der Zellgabe. In unserem System wurden die therapeutischen Zellen zeitgleich mit der Transplantation i.v. appliziert. Es ist bislang wenig darüber bekannt, wie schnell die Migration der Zellen in das Transplantat, die regionalen Lymphknoten und die Milz erfolgt. Auch die durch die alloreaktive Aktivierung verstärkte Transgenaktivierung wird eine gewisse Zeitspanne benötigen, in der die Initiation der allogenen Immunantwort bereits stattgefunden haben könnte. Die Generierung von alloreaktiven Effektorzellen findet vorwiegend im Transplantat und den regionalen Lymphknoten statt. Eine Schlüsselrolle spielen dabei die Dendritischen Zellen, die ebenso wie vIL-10 und IL-10 im Zusammenhang bei der Entstehung von regulatorischen T-Zellen diskutiert werden (Jonuleit et al, 2001). Dendritische Zellen kommen

in zwei Aktivierungsstufen vor. Unreife Vorläufer DCs (Monozyten) wandern, durch Entzündung, Pathogene oder Zytokine angeregt, in das Gewebe ein (Roncarolo et al, 2001). Die Reifung der DCs erfolgt im Zusammenhang mit der Beladung der DCs mit Peptiden und ihrer darauffolgenden Wanderung zu den regionalen Lymphknoten. Hier findet die Aktivierung von naiven Lymphozyten über reife DCs statt (Lanzavecchia and Sallusto, 2001). Es ist bislang jedoch weder bekannt, wann und wo regulatorische T-Zellen entstehen, noch ob unterschiedliche Subtypen der regulatorischen Zellen die Th1 und Th2 Immunantwort regulieren. Der Wirkungsmechanismus von vIL-10 und IL-10 kann auf verschiedenen Ebenen vermittelt werden. Zum einen ist vorstellbar, dass vIL-10 die Generierung von IL-10 produzierenden T-Zellen über APCs induziert, zum anderen könnte vIL-10 auch direkt auf die T-Zellen wirken. Da eine inhibitorische Wirkung auf DCs und Makrophagen bereits in verschiedenen Modellen nachgewiesen werden konnte und IL-10 behandelte DCs Toleranz induzieren, ist der Wirkungsmechanismus über DCs sehr wahrscheinlich (Steinbrink et al, 1997, 2002). Es besteht die Möglichkeit, dass der Zeitpunkt des adoptiven Transfers der transgenen T-Lymphozyten nicht optimal für die Entwicklung einer regulativen, immunsuppressiven Immunantwort ist. Es konnte bereits im Maus-Transplantations-Modell gezeigt werden, dass eine Vorbehandlung mit IL-10 mit anschließender allogener Herztransplantation zur einer Verlängerung der Transplantatüberlebenszeit führt (Li et al, 1999). Da der Wirkungsmechanismus von vIL-10 und auch IL-10 wahrscheinlich hauptsächlich über die Inhibierung der DCs erfolgt, könnte es sinnvoll sein, die transgenen T-Lymphozyten bereits vor der allogenen Transplantation adoptiv zu applizieren. So könnte bereits vor dem ersten Antigenkontakt zwischen Alloantigen und DC eine Milieu geschaffen werden, welches die allogene Immunantwort effektiv inhibiert. Ein wiederholter adoptiver Transfer könnte diesen Effekt zusätzlich unterstützen. Diese Untersuchungen werden derzeit durchgeführt.

6.5.5 Th1 Phänotyp der T_{vIL-10}-Lymphozyten.

Der stark ausgeprägte Th1 Phänotyp der T_{vIL-10}-Lymphozyten stellt eine weitere zentrale Problematik in diesem Modell dar. Der adoptive Transfer von 15×10^6 alloreaktiven T_{EGFP}-Lymphozyten führt zwar nicht zu einer akzelerierten Abstoßung, dennoch ist nicht auszuschließen, dass der Th1 Phänotyp zu einer Inhibierung der immunmodulatorischen Effekte von vIL-10 führt (Hammer et al, 2002). In zahlreichen Modellen konnte bereits gezeigt werden, dass die akute Rejektion einhergeht mit der Expression von Th1 Zytokinen

(IL-2, IFN- γ). In Modellen, die zu einer Verlängerung der Transplantatüberlebenszeit führen, sind dagegen Th2 Zytokine (IL-4) zu detektieren (Heidecke et al, 1996). Es ist nicht auszuschließen, dass der Th1 Phänotyp der transgenen T-Lymphozyten einen negativen Einfluss auf die regulatorischen, immunsuppressiven Eigenschaften der Zellen selbst ausübt. Eine Alternative ist die Herstellung alloantigen-spezifischen und transgenen T-Zelllinie, die einen Th2 Phänotyp aufweist. Dieses könnte möglich sein, durch die Gegenwart von anti-IL-12 mAk und IL-4 schon während der ersten MLC. Der limitierende Faktor ist zur Zeit, dass es noch keinen monoklonalen Ak gegen IL-12 im Rattensystem gibt. Dass die Anwesenheit von anti-IL-12 und IL-4 zur Generierung von Th2 T-Zellen führt konnte bereits im Maus-System gezeigt werden.

6.5.6 Alloreaktivität und Zytotoxizität der T_{VIL-10}-Lymphozyten.

CD4⁺ allospezifische Effektor-T-Zellen mit einem Th1 Phänotyp sind die Hauptinitiatoren der akuten Rejektion. Da die *in vitro* generierten transgenen T-Lymphozyten den gleichen Phänotyp aufweisen und ebenfalls allospezifisch sind, könnten die genmodifizierten Zellen selbst eine Rejektion auslösen. Es konnte gezeigt werden, dass die *in vitro* gewonnenen alloantigen-spezifischen Lymphozyten nur bei Applikation in einer sehr großen Zellzahl (50×10^6 Zellen) ein Transplantat in einer subletal bestrahlten Ratte abstoßen konnten (Hammer et al, 2001). Die Applikation von geringeren Zellzahlen, wie in unseren Modell verwendet, führen jedoch nicht zu einer akzelerierten Rejektion. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine Toleranzinduktion, vermittelt über den nicht-depletierenden anti-CD4 Antikörper, nicht durch den adoptiven Transfer von 15×10^6 alloantigen-spezifischen T-Lymphozyten verhindert wurde (Dr. Lehmann, pers. Mitteilung). Des weiteren sind Studien zur Zytotoxizität der transgenen Zellen erforderlich, um herauszufinden, ob die transgenen Effektor T-Zellen eventuell das allogene Gewebe vermittelt über einen zytotoxischen Effekt zerstören.

6.6 Gentherapie und Biosicherheit

Der molekularbiologische Aufbau der Retroviren zeichnet sich unter anderem durch ihre Fähigkeit aus in die DNA des Wirtsgenom zu integrieren. Die Integration erfolgt über bestimmte repetitive Elemente, den „long terminal repeats“ (LTR) der Retroviren. Diese Sequenzbereiche besitzen außerdem Promoter-Eigenschaften, so dass die heute verwendeten retroviralen Expressionsvektoren oftmals minimiert sind auf die Bereiche: 5’LTR, Verpackungssignal, Transgen, Poly A Signal, Resistenzgen und 3’LTR (Walther and Stein,

2000). Die Integration des Virus und auch des viralen Expressionsvektors erfolgt zufällig, so dass die Möglichkeit eines DNA-Defektes und somit eine onkogene Transformation der Wirtszelle nicht ausgeschlossen werden kann (Haviernik et al, 2002). Durch die Transduktion der T-Lymphozyten *in vitro* ist jedoch die Möglichkeit vorhanden, diese vor dem adoptiven Transfer hinsichtlich ihrer onkogenen Entartung zu untersuchen, so dass dieses Risiko kalkulierbarer, jedoch nicht völlig auszuschließen ist. Das System der Verpackungszelllinie ist so aufgebaut, dass die retroviralen Proteine zur Bildung der Hülle, Strukturmatrix und Enzyme des Retrovirus (gag, env, pol) stabil aber ohne Verpackungssignal in das Genom der Zelllinie eingebaut sind. Auf dem retroviralen Vektor hingegen sind diese Gene deletiert, das Verpackungssignal ist aber vorhanden. Nach der Transfektion des Vektors in die Zelle kann ein infektiöses Virus gebildet werden, das replikationsdefekt ist, dadurch dass die Gene gag, pol und env nicht mitverpackt werden. Theoretisch besteht die Möglichkeit der homologen Rekombination zwischen den getrennt lokalisierten Genabschnitten gag, env und pol mit dem retroviralen Plasmid und damit die Möglichkeit der Generierung neuer replikationsfähiger Viren. Durch Analysen des Zellkulturüberstandes der transduzierten Zellen auf das Vorhandensein teilungsfähiger Viren kann das Risiko der Übertragung replikationskompetenter Viren minimiert werden. Ein weiterer Punkt der Biosicherheit betrifft die Aktivierung eventuell vorhandener endogener Viren durch den retroviralen Vektor. Molekulare und zelluläre Mechanismen sind jedoch noch wenig bekannt, so dass dieser Aspekt meiner Meinung nach der sensibelste Punkt bei der Verwendung von viralen Expressionssystemen in der Gentherapie beinhaltet. Eine *in vivo* Applikation im Menschen ist deshalb sehr gründlich und gewissenhaft zu diskutieren. An dieser Stelle ist ausdrücklich darauf hinzuweisen, dass bei dem verwendeten Modell nicht der virale Transduktionsweg im Vordergrund steht, sondern die Ausnutzung der alloantigen-spezifischen Migrations- und Aktivierungsmechanismen der genmodifizierten Zellen. Die Entwicklung neuer nicht-viraler Methoden, bzw. der Einsatz von weiterentwickelten sehr sicheren viralen Systemen zur Generierung transgener Lymphozyten, wird die Biosicherheit erheblich erhöhen.

Abkürzungsverzeichnis

Ad	Adenovirus
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
allo	allogen
APC	antigen presenting cell, Antigen präsentierende Zelle
CD	cluster of differentiation, Differenzierungsgruppen
cDNA	komplementäre DNA
CFDA-SE	carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester
cfu	colonie forming unit, Kolonie bildende Einheit
CMV	Cytomegalie Virus
Cy A	Cyclosporin A
DA	Dark Agouti
DC	dendritic cell, Dendritische Zelle
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTH	delayed type hypersensitivity, Verspätete Typen der Überempfindlichkeit
DTT	Dithioerythrol
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EBV	Epstein Barr Virus
EGFP	enhanced green fluorescent protein, verstärktes grün-leuchtendes Protein
ELISA	enzyme linked immunoabsorbent assay, enzymatischer Protein-Detektions-Test
env	retrovirale Sequenz, kodierend für Hüllproteine
FACS	fluorescent activated cell sorting, Fluoreszenzaktivierter Zellsorter
FasL	Fas-Ligand
FKS	fötales Kälberserum
gag	retrovirale Sequenz, kodierend für Strukturproteine
GAPDH	Glyzerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase
HLA	human leukocyte antigens, Humanes Leukozyten-Antigen
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IL-R	Interleukin Rezeptor
INOS	induzierbare NO Synthetase
i.v.	intravenös
kb	Kilobasen
LE	Lewis
LPS	Lipopolysaccharid
LTR	long terminal repeats
M	molar = m/l
MFI	mittlere Fluoreszenz-Intensität
MHC	major histocompatibility complex
min	Minute
MLC	mixed lymphocyte culture, gemischte Lymphozytenkultur
NFAT	nukleärer Faktor aktivierter T-Zellen, DNA-bindender Transkriptionsfaktor
NFκB	nukleärer Faktor kappa B, DNA-bindender Transkriptionsfaktor
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
PBMC	periphere mononukleäre Blutlymphozyten
PBS	phosphat buffered saline, Phosphatpuffer
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PE	Phytoericitin
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetat
pol	retrovirale Sequenz, kodierend für Enzyme
RNA	Ribonukleinsäure

RT	Reverse Transkriptase
s	Sekunde
s.c.	subcutan
SOP	standard operation protocol, standardisiertes Protokoll
syn	syngen
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TCM	T-Zell-Medium
TCR	T-Zell-Rezeptor
TGF- β	transforming growth factor beta, transformierender Wachstumsfaktor beta
Th-Zelle	T-Helfer-Zelle
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor alpha
Tx	Transplantation
U	Unit
UV	ultraviolettes Licht

Literaturverzeichnis

Annacker O, Burlen-Defranoux O, Pimenta-Araujo R, Cumano A, Bandeira A. Regulatory CD4 T cells control the size of the peripheral activated/memory CD4 T cell compartment. *J Immunol.* **2000** Apr 1;164(7):3573-80.

Annacker O, Pimenta-Araujo R, Burlen-Defranoux O, Barbosa TC, Cumano A, Bandeira A. CD25+ CD4+ T cells regulate the expansion of peripheral CD4 T cells through the production of IL-10. *J Immunol.* **2001** Mar 1;166(5):3008-18.

Asseman C, Mauze S, Leach MW, Coffman RL, Powrie F. An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. *J Exp Med.* **1999** Oct 4;190(7):995-1004.

Auchincloss H Jr, Sultan H. Antigen processing and presentation in transplantation. *Curr Opin Immunol.* **1996** Oct;8(5):681-7.

Bacchetta R, Bigler M, Touraine JL, Parkman R, Tovo PA, Abrams J, de Waal Malefyt R, de Vries JE, Roncarolo MG. High levels of interleukin 10 production in vivo are associated with tolerance in SCID patients transplanted with HLA mismatched hematopoietic stem cells. *J Exp Med.* **1994** Feb 1;179(2):493-502.

Badrichani AZ, Ferran C. A20 and BCL proteins exert a broad and complementary cytoprotective effect in endothelial cells via blockade of NF-kappaB and NFAT. *Transplant Proc.* **2001** Feb-Mar;33(1-2):450.

Baecher-Allan C, Brown JA, Freeman GJ, Hafler DA. CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood. *J Immunol.* **2001** Aug 1;167(3):1245-53.

Bejarano MT, de Waal Malefyt R, Abrams JS, Bigler M, Bacchetta R, de Vries JE, Roncarolo MG. Interleukin 10 inhibits allogeneic proliferative and cytotoxic T cell responses generated in primary mixed lymphocyte cultures. *Int Immunol.* **1992** Dec;4(12):1389-97.

Bellgrau D, Gold D, Selawry H, Moore J, Franzusoff A, Duke RC. A role for CD95 ligand in preventing graft rejection. *Nature.* **1995** Oct 19;377(6550):630-2.

Benichou G. Direct and indirect antigen recognition: the pathways to allograft immune rejection. *Front Biosci.* **1999** May 15;4:D476-80.

Beverly B, Kang SM, Lenardo MJ, Schwartz RH. Reversal of in vitro T cell clonal anergy by IL-2 stimulation. *Int Immunol.* **1992** Jun;4(6):661-71.

Blaese RM, Culver KW, Miller D, Carter C, Fleisher T, Clerici M, Shearer G, Chang L, Chiang Y, Tolsthev P, Grennblatt JJ, Rosenberg SA, Klein H, Berger M, Mullen CA, Ramsey WJ, Muul L, Morgan RA, Anderson WF. T-Lymphocyte-Directed Gene Therapie for ADA- SCID: Initial Trial Results After 4 Years. *Science* **1995**; 270: 475-477.

Blazar BR, Taylor PA, Panoskaltsis-Mortari A, Narula SK, Smith SR, Roncarolo MG, Vallera DA. Interleukin-10 dose-dependent regulation of CD4+ and CD8+ T cell-mediated graft-versus-host disease. *Transplantation.* **1998** Nov 15;66(9):1220-9.

Bollard CM, Heslop HE, Brenner MK. Gene-marking studies of hematopoietic cells. *Int J Hematol.* **2001** Jan;73(1):14-22.

Briscoe DM, Alexander SI, Lichtman AH. Interactions between T lymphocytes and endothelial cells in allograft rejection. *Curr Opin Immunol.* **1998** Oct;10(5):525-31.

Burns J.C., Friedmann T., Driever W., Burrascano M., and Yee J.K. Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: Concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1993** 90: 8033 – 8037.

Campos L, Deli BC, Kern JH, Kim JI, Naji A, Barker CF, Markmann JF. Survival of MHC deficient mouse heterotopic cardiac allografts and xenografts. *Transplant Proc.* **1995** Feb;27(1):254-5.

Chan SY, Goodman RE, Szmuszkovicz JR, Roessler B, Eichwald EJ, Bishop DK. DNA-liposome versus adenoviral mediated gene transfer of transforming growth factor beta1 in vascularized cardiac allografts: differential sensitivity of CD4+ and CD8+ T cells to transforming growth factor beta1. *Transplantation.* **2000** Nov 15;70(9):1292-301.

Ciancio G, Burke GW, Miller J. Current treatment practice in immunosuppression. *Expert Opin Pharmacother.* **2000** Dec;1(7):1307-30.

Cjtte I, Rogers NJ, Lechler RI. Allorecognition. *Transfus Clin Biol.* **2001** Jun;8(3):318-23.

Cobbold S, Waldmann H. Infectious tolerance. *Curr Opin Immunol.* **1998** Oct;10(5):518-24.

Coito AJ, Kupiec-Weglinski JW. Extracellular matrix proteins: bystanders or active participants in the allograft rejection cascade? *Ann Transplant.* **1996**;1(3):14-8.

Contreras JL, Bilbao G, Smyth CA, Jiang XL, Eckhoff DE, Jenkins SM, Thomas FT, Curiel DT, Thomas JM. Cytoprotection of pancreatic islets before and soon after transplantation by gene transfer of the anti-apoptotic Bcl-2 gene. *Transplantation.* **2001** Apr 27;71(8):1015-23.

Croft M. Activation of naive, memory and effector T cells. *Curr Opin Immunol.* **1994** Jun;6(3):431-7.

David A, Chetritt J, Guillot C, Tesson L, Heslan JM, Cuturi MC, Soulillou JP, Anegon I. Interleukin-10 produced by recombinant adenovirus prolongs survival of cardiac allografts in rats. *Gene Ther.* **2000** Mar;7(6):505-10.

de Waal Malefyt R, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, de Vries JE. Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med.* **1991a** Nov 1;174(5):1209-20.

de Waal Malefyt R, Haanen J, Spits H, Roncarolo MG, te Velde A, Figdor C, Johnson K, Kastelein R, Yssel H, de Vries JE. Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. *J Exp Med.* **1991b** Oct 1;174(4):915-24.

DeBruyne LA, Li K, Chan SY, Qin L, Bishop DK, Bromberg JS. Lipid-mediated gene transfer of viral IL-10 prolongs vascularized cardiac allograft survival by inhibiting donor-specific cellular and humoral immune responses. *Gene Ther* **1998** Aug;5(8):1079-87

Ding Y, Qin L, Zamarin D, Kotenko SV, Pestka S, Moore KW, Bromberg JS. Differential IL-10R1 expression plays a critical role in IL-10-mediated immune regulation. *J Immunol.* **2001** Dec 15;167(12):6884-92.

Dunn CJ, Wagstaff AJ, Perry CM, Plosker GL, Goa KL. Cyclosporin: an updated review of the pharmacokinetic properties, clinical efficacy and tolerability of a microemulsion-based formulation (neoral)¹ in organ transplantation. *Drugs.* **2001**;61(13):1957-2016.

Emery DW, Sablinski T, Shimada H, Germana S, Gianello P, Foley A, Shulman S, Arn S, Fishman J, Lorf T, Nিকেleit V, Colvin RB, Sachs DH, LeGuern C. Expression of an allogeneic MHC DRB transgene, through retroviral transduction of bone marrow, induces specific reduction of alloreactivity. *Transplantation.* **1997** Nov 27;64(10):1414-23.

Finkelman FD, Morris SC, Orekhova T, Mori M, Donaldson D, Reiner SL, Reilly NL, Schopf L, Urban JF Jr. Stat6 regulation of in vivo IL-4 responses. *J Immunol.* **2000** Mar 1;164(5):2303-10.

Flugel A, Berkowicz T, Ritter T, Labeur M, Jenne DE, Li Z, Ellwart JW, Willem M, Lassmann H, Wekerle H. Migratory activity and functional changes of green fluorescent effector cells before and during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Immunity.* **2001** May;14(5):547-60.

Flugel A, Willem M, Berkowicz T, Wekerle H. Gene transfer into CD4⁺ T lymphocytes: green fluorescent protein-engineered, encephalitogenic T cells illuminate brain autoimmune responses. *Nat Med.* **1999** Jul;5(7):843-7.

Frauwirth KA, Thompson CB. Activation and inhibition of lymphocytes by costimulation. *J Clin Invest.* **2002** Feb;109(3):295-9.

Gajewski TF, Goldwasser E, Fitch FW. Anti-proliferative effect of IFN-gamma in immune regulation. II. IFN-gamma inhibits the proliferation of murine bone marrow cells stimulated with IL-3, IL-4, or granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J Immunol.* **1988** Oct 15;141(8):2635-42.

Geissler EK, Graeb C, Tange S, Guba M, Jauch KW, Scherer MN. Effective use of donor MHC class I gene therapy in organ transplantation: prevention of antibody-mediated hyperacute heart allograft rejection in highly sensitized rat recipients. *Hum Gene Ther.* **2000** Feb 10;11(3):459-69.

Goudy K, Song S, Wasserfall C, Zhang YC, Kapturczak M, Muir A, Powers M, Scott-Jorgensen M, Campbell-Thompson M, Crawford JM, Ellis TM, Flotte TR, Atkinson MA. Adeno-associated virus vector-mediated IL-10 gene delivery prevents type 1 diabetes in NOD mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2001** Nov 20;98(24):13913-8.

Gould DS, Auchincloss H Jr. Direct and indirect recognition: the role of MHC antigens in graft rejection. *Immunol Today.* **1999** Feb;20(2):77-82.

Graca L, Thompson S, Lin CY, Adams E, Cobbold SP, Waldmann H. Both CD4(+)CD25(+) and CD4(+)CD25(-) Regulatory Cells Mediate Dominant Transplantation Tolerance. *J Immunol* **2002** Jun 1;168(11):5558-65

Greil R, Egle A, Villunger A. On the role and significance of Fas (Apo-1/CD95) ligand (FasL) expression in immune privileged tissues and cancer cells using multiple myeloma as a model. *Leuk Lymphoma*. **1998** Nov;31(5-6):477-90.

Groux H, Bigler M, de Vries JE, Roncarolo MG. Interleukin-10 induces a long-term antigen-specific anergic state in human CD4⁺ T cells. *J Exp Med*. **1996** Jul 1;184(1):19-29.

Groux H, O'Garra A, Bigler M, Rouleau M, Antonenko S, de Vries JE, Roncarolo MG. A CD4⁺ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature*. **1997** Oct 16;389(6652):737-42.

Guillot C, Guillonneau C, Mathieu P, Gerdes CA, Menoret S, Braudeau C, Tesson L, Renaudin K, Castro MG, Lowenstein PR, Anegón I. Prolonged blockade of CD40-CD40 ligand interactions by gene transfer of CD40Ig results in long-term heart allograft survival and donor-specific hyporesponsiveness, but does not prevent chronic rejection. *J Immunol*. **2002** Feb 15;168(4):1600-9.

Hammer MH, Flugel A, Seifert M, Lehmann M, Brandt C, Volk HD, Ritter T. Potential of allospecific gene-engineered T cells in transplantation gene therapy: specific T cell activation determines transgene expression in vitro and in vivo. *Hum Gene Ther*. **2000** Jun 10;11(9):1303-11.

Hammer MH, Schroder G, Risch K, Flugel A, Volk HD, Lehmann M, Ritter T. Antigen-dependent transgene expression in kidney transplantation: a novel approach using gene-engineered T lymphocytes. *J Am Soc Nephrol*. **2002** Feb;13(2):511-8.

Hammer MH, Zhai Y, Katori M, Ritter T, Volk HD, Coito AJ, Kupiec-Weglinski JW. Homing of in vitro-generated donor antigen-reactive CD4⁺ T lymphocytes to renal allografts is alpha 4 beta 1 but not alpha L beta 2 integrin dependent. *J Immunol*. **2001** Jan 1;166(1):596-601.

Haviernik P, Festin SM, Opavsky R, Koller RP, Barr NI, Neil JC, Wolff L. Linkage on chromosome 10 of several murine retroviral integration loci associated with leukaemia. *J Gen Virol*. **2002** Apr;83(Pt 4):819-27.

Heidecke CD, Hancock WW, Westerholt S, Sewczik T, Jakobs F, Zantl N, Varzaru A, Siegling A, Kurrel R, Deusch K, Volk HD, Kupiec-Weglinski JW. alpha/beta-T cell receptor-directed therapy in rat allograft recipients. Long-term survival of cardiac allografts after pretreatment with R73 mAb is associated with upregulation of Th2-type cytokines. *Transplantation*. **1996** Mar 27;61(6):948-56.

Henke PK, DeBrunye LA, Strieter RM, Bromberg JS, Prince M, Kadell AM, Sarkar M, Lundy F, Wakefield TW. Viral IL-10 gene transfer decreases inflammation and cell adhesion molecule expression in a rat model of venous thrombosis. *J Immunol*. **2000** Feb 15;164(4):2131-41.

Hernandez-Fuentes MP, Baker RJ, Lechler RI. The alloresponse. *Rev Immunogenet*. **1999**;1(3):282-96.

Hutloff A, Dittrich AM, Beier KC, Eljaschewitsch B, Kraft R, Anagnostopoulos I, Kroczeck RA. ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. *Nature*. **1999** Jan 21;397(6716):263-6.

Ito S, Camussi G, Tetta C, Milgrom F, Andres G. Hyperacute renal allograft rejection in the rabbit. The role of platelet-activating factor and of cationic proteins derived from polymorphonuclear leukocytes and from platelets. *Lab Invest.* **1984** Aug;51(2):148-61.

Janeway AC, Travers P. Immunologie. **1995** Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, S.163-170,

Jonuleit H, Schmitt E, Steinbrink K, Enk AH. Dendritic cells as a tool to induce anergic and regulatory T cells. *Trends Immunol.* **2001** Jul;22(7):394-400.

Josien R, Heslan M, Brouard S, Souillou JP, Cuturi MC. Critical requirement for graft passenger leukocytes in allograft tolerance induced by donor blood transfusion. *Blood.* **1998** Dec 15;92(12):4539-44.

Kato H, Ritter T, Ke B, Murakami M, Kusano M, Busuttil RW, Kupiec-Weglinski JW. Adenovirus-mediated gene transfer of IL-4 prolongs rat renal allograft survival and inhibits the p21(ras)-activation pathway. *Transplant Proc.* **2000** Mar;32(2):245-6.

Kawamoto S, Nitta Y, Tashiro F, Nakano A, Yamato E, Tahara H, Tabayashi K, Miyazaki J. Suppression of T(h)1 cell activation and prevention of autoimmune diabetes in NOD mice by local expression of viral IL-10. *Int Immunol.* **2001** May;13(5):685-94.

Ke B, Coito AJ, Kato H, Zhai Y, Wang T, Sawitzki B, Seu P, Busuttil RW, Kupiec-Weglinski JW. Fas ligand gene transfer prolongs rat renal allograft survival and down-regulates anti-apoptotic Bag-1 in parallel with enhanced Th2-type cytokine expression. *Transplantation.* **2000** Apr 27;69(8):1690-4.

Ke B, Ritter T, Kato H, Zhai Y, Li J, Lehmann M, Busuttil RW, Volk HD, Kupiec-Weglinski JW. Regulatory cells potentiate the efficacy of IL-4 gene transfer by up-regulating Th2-dependent expression of protective molecules in the infectious tolerance pathway in transplant recipients. *J Immunol.* **2000** Jun 1;164(11):5739-45.

Khayyamian S, Hutloff A, Buchner K, Grafe M, Henn V, Kroczeck RA, Mages HW. ICOS-ligand, expressed on human endothelial cells, costimulates Th1 and Th2 cytokine secretion by memory CD4+ T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2002** Apr 30;99(9):6198-203.

Kindred B. Rejection of skin grafts from different inbred strains by nude mice reconstituted with allogeneic or congenic thymus cell suspensions. *Eur J Immunol.* **1974** May;4(5):388-9.

Kingsley CI, Karim M, Bushell AR, Wood KJ. CD25+CD4+ regulatory T cells prevent graft rejection: CTLA-4- and IL-10-dependent immunoregulation of alloresponses. *J Immunol.* **2002** Feb 1;168(3):1080-6.

Kirbey JA., Funktion of Leukocyte Adhesion Molecules During Allograft Rejection, in *transplantation Biology*, N.L. Tilney, T.B. Strom, and L.C. Paul, Editors. **1996**, Lippincott-Raven: New York. P. 137-150.

Kirk AD, Burkly LC, Batty DS, Baumgartner RE, Berning JD, Buchanan K, Fechner JH Jr, Germond RL, Kampen RL, Patterson NB, Swanson SJ, Tadaki DK, TenHoor CN, White L, Knechtle SJ, Harlan DM. Treatment with humanized monoclonal antibody against CD154 prevents acute renal allograft rejection in nonhuman primates. *Nat Med.* **1999** Jun;5(6):686-93.

Kirk CJ, Mule JJ. Gene-modified dendritic cells for use in tumor vaccines. *Hum Gene Ther.* **2000** Apr 10;11(6):797-806.

Knechtle SJ, Kirk AD, Fechner JH Jr, Hong X, Dong Y, Hamawy MM, Harlan DM. Inducing unresponsiveness by the use of anti-CD3 immunotoxin, CTLA4-Ig, and anti-CD40 ligand. *Transplant Proc.* **1999** May;31(3B Suppl):27S-28S.

Lalor PF, Adams DH. Lymphocyte homing to allografts. *Transplantation.* **2000** Oct 27;70(8):1131-9.

Lanzavecchia A, Sallusto F. Regulation of T cell immunity by dendritic cells. *Cell.* **2001** Aug 10;106(3):263-6.

Laskowski IA, Pratschke J, Wilhelm MJ, Dong VM, Beato F, Taal M, Gasser M, Hancock WW, Sayegh MH, Tilney NL. Anti-CD28 monoclonal antibody therapy prevents chronic rejection of renal allografts in rats. *J Am Soc Nephrol.* **2002** Feb;13(2):519-27.

Lehmann M, Graser E, Risch K, Hancock WW, Muller A, Kuttler B, Hahn HJ, Kupiec-Weglinski JW, Brock J, Volk HD. Anti-CD4 monoclonal antibody-induced allograft tolerance in rats despite persistence of donor-reactive T cells. *Transplantation.* **1997** Oct 27;64(8):1181-7.

Lehmann M, Sternkopf F, Metz F, Brock J, Docke WD, Plantikow A, Kuttler B, Hahn HJ, Ringel B, Volk HD. Induction of long-term survival of rat skin allografts by a novel, highly efficient anti-CD4 monoclonal antibody. *Transplantation.* **1992** Dec;54(6):959-62.

Levy, J.A.. The Retroviridae, 1,2. **1992** Plenum Press, New York and London.

Li W, Fu F, Lu L, Narula SK, Fung JJ, Thomson AW, Qian S. Recipient pretreatment with mammalian IL-10 prolongs mouse cardiac allograft survival by inhibition of anti-donor T cell responses. *Transplant Proc.* **1999** Feb-Mar;31(1-2):115.

Li W, Lu L, Li Y, Fu F, Fung JJ, Thomson AW, Qian S. High-dose cellular IL-10 exacerbates rejection and reverses effects of cyclosporine and tacrolimus in Mouse cardiac transplantation. *Transplant Proc.* **1997** Feb-Mar;29(1-2):1081-2.

Liew FY. T(H)1 and T(H)2 cells: a historical perspective. *Nature Rev Immunol.* **2002** Jan;2(1):55-60.

Lowry RP. DTH-Induced Injury, in *Transplantation Biology*, N.L.Tilney, T.B. Strom, and L.C. Paul, Editors. **1996**, Lippincott-Raven: New York. P. 487-502.

Lu L, Gambotto A, Lee WC, Qian S, Bonham CA, Robbins PD, Thomson AW. Adenoviral delivery of CTLA4Ig into myeloid dendritic cells promotes their in vitro tolerogenicity and survival in allogeneic recipients. *Gene Ther.* **1999** Apr;6(4):554-63.

Medawar PB. *Memoir of a thinking radish.* **1986** Oxford University Press, Oxford,

Merville P, Pouteil-Noble C, Wijdenes J, Potaux L, Touraine JL, Banchereau J. Detection of single cells secreting IFN-gamma, IL-6, and IL-10 in irreversibly rejected human kidney allografts, and their modulation by IL-2 and IL-4. *Transplantation.* **1993** Mar;55(3):639-46.

Miller JF, Kurts C, Allison J, Kosaka H, Carbone F, Heath WR. Induction of peripheral CD8+ T-cell tolerance by cross-presentation of self antigens. *Immunol Rev.* **1998** Oct;165:267-77.

Miller, A.D., Garcia, J.,V; von Suhr, N., Lynch, C.M., Wilson, C., and Eiden, M.V. Construction and properties of retrovirus packaging cells based on gibbon ape leukemia virus. *J. Virol.* **1991** 65: 2220 - 2224.

Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol.* **2001**;19:683-765.

Mosmann TR, Coffman RL. Heterogeneity of cytokine secretion patterns and functions of helper T cells. *Adv Immunol.* **1989**;46:111-47.

Muller A, Schmitt L, Raftery M, Schonrich G. Paralysis of B7 co-stimulation through the effect of viral IL-10 on T cells as a mechanism of local tolerance induction. *Eur J Immunol.* **1998** Nov;28(11):3488-98.

Najafian N, Sayegh MH. CTLA4-Ig: a novel immunosuppressive agent. *Expert Opin Investig Drugs.* **2000** Sep;9(9):2147-57.

Nakamura K, Kitani A, Strober W. Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. *J Exp Med.* **2001** Sep 3;194(5):629-44.

Naldini L. Lentiviruses as gene transfer agents for delivery to non-dividing cells. *Curr Opin Biotechnol.* **1998** Oct;9(5):457-63. Review.

Naviaux RK, Verma IM. Retroviral vectors for persistent expression in vivo. *Curr Opin Biotechnol.* **1992** Oct;3(5):540-7.

Neefjes JJ, Momburg F, Hammerling GJ. Selective and ATP-dependent translocation of peptides by the MHC-encoded transporter. *Science.* **1993** Aug 6;261(5122):769-71.

Nishikawa M, Huang L. Nonviral vectors in the new millennium: delivery barriers in gene transfer. *Hum Gene Ther.* **2001** May 20;12(8):861-70. Review.

Ode-Hakim S, Docke WD, Kern F, Emmrich F, Volk HD, Reinke P. Delayed-type hypersensitivity-like mechanisms dominate late acute rejection episodes in renal allograft recipients. *Transplantation.* **1996** Apr 27;61(8):1233-40.

Oluwole SF, Chowdhury NC, Jin MX, Hardy MA. Acquired systemic tolerance to islet allografts induced by intrathymic inoculation of alloantigens--a brief review. *Ann Transplant.* **1997**;2(3):81-5.

Ono K, Lindsey ES, Creech O Jr. Transplanted rat heart: local graft irradiation. *Transplantation.* **1969** Mar;7(3):176-82.

Onodera K, Chandraker A, Volk HD, Lehmann M, Korom S, Stadlbauer TH, Kato K, Kasai S, Sayegh MH, Kupiec-Weglinski JW. Role of regulatory T cells in the "infectious" tolerance pathway in transplant recipients. *Transplant Proc.* **1998** Feb;30(1):13-5.

- Onodera K, Lehmann M, Akalin E, Volk HD, Sayegh MH, Kupiec-Weglinski JW.** Induction of "infectious" tolerance to MHC-incompatible cardiac allografts in CD4 monoclonal antibody-treated sensitized rat recipients. *J Immunol.* **1996** Sep 1;157(5):1944-50.
- Onodera K, Volk HD, Ritter T, Kupiec-Weglinski JW.** Thymus requirement and antigen dependency in the "infectious" tolerance pathway in transplant recipients. *J Immunol.* **1998** Jun15;160(12):5765-72.
- Orosz CG, Pelletier RP.** Chronic remodeling pathology in grafts. *Curr Opin Immunol.* **1997** Oct;9(5):676-80.
- Ouyang W, Lohning M, Gao Z, Assenmacher M, Ranganath S, Radbruch A, Murphy KM.** Stat6-independent GATA-3 autoactivation directs IL-4-independent Th2 development and commitment. *Immunity.* **2000** Jan;12(1):27-37.
- Pathan AA, Wilkinson KA, Wilkinson RJ, Latif M, McShane H, Pasvol G, Hill AV, Lalvani A.** High frequencies of circulating IFN-gamma-secreting CD8 cytotoxic T cells specific for a novel MHC class I-restricted Mycobacterium tuberculosis epitope in M. tuberculosis-infected subjects without disease. *Eur J Immunol.* **2000** Sep;30(9):2713-21.
- Penn I.** Post-transplant malignancy: the role of immunosuppression. *Drug Saf.* **2000** Aug;23(2):101-13.
- Pennycuik PR.** Unresponsiveness of nude mice to skin allografts. *Transplantation.* **1971** Apr;11(4):417-8.
- Perez VL, Van Parijs L, Biuckians A, Zheng XX, Strom TB, Abbas AK.** Induction of peripheral T cell tolerance in vivo requires CTLA-4 engagement. *Immunity.* **1997** Apr;6(4):411-7.
- Piccirillo CA, Shevach EM.** Cutting edge: control of CD8+ T cell activation by CD4+CD25+ immunoregulatory cells. *J Immunol.* **2001** Aug 1;167(3):1137-40.
- Pleyer U, Bertelmann E, Rieck P, Hartmann C, Volk HD, Ritter T.** Survival of corneal allografts following adenovirus-mediated gene transfer of interleukin-4. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* **2000** Jun;238(6):531-6.
- Pober JS, Orosz CG, Rose ML, Savage CO.** Can graft endothelial cells initiate a host anti-graft immune response? *Transplantation.* **1996** Feb 15;61(3):343-9.
- Qian S, Li W, Li Y, Fu F, Lu L, Fung JJ, Thomson AW.** Systemic administration of cellular interleukin-10 can exacerbate cardiac allograft rejection in mice. *Transplantation.* **1996** Dec 27;62(12):1709-14.
- Qin L, Chavin KD, Ding Y, Favaro JP, Woodward JE, Lin J, Tahara H, Robbins P, Shaked A, Ho DY, et al.** Multiple vectors effectively achieve gene transfer in a murine cardiac transplantation model. Immunosuppression with TGF-beta 1 or vIL-10. *Transplantation.* **1995** Mar 27;59(6):809-16.
- Qin L, Chavin KD, Ding Y, Tahara H, Favaro JP, Woodward JE, Suzuki T, Robbins PD, Lotze MT, Bromberg JS.** Retrovirus-mediated transfer of viral IL-10 gene prolongs murine cardiac allograft survival. *J Immunol.* **1996** Mar 15;156(6):2316-23.

- Qin L, Ding Y, Pahud DR, Robson ND, Shaked A, Bromberg JS.** Adenovirus-mediated gene transfer of viral interleukin-10 inhibits the immune response to both alloantigen and adenoviral antigen. *Hum Gene Ther.* **1997** Jul 20;8(11):1365-74.
- Qin L, Ding Y, Tahara H, Bromberg JS.** Viral IL-10-induced immunosuppression requires Th2 cytokines and impairs APC function within the allograft. *J Immunol.* **2001** Feb 15;166(4):2385-93.
- Qin S, Cobbold SP, Pope H, Elliott J, Kioussis D, Davies J, Waldmann H.** "Infectious" transplantation tolerance. *Science.* **1993** Feb 12;259(5097):974-7.
- Quinn ER, Lum LG, Trevor KT.** T cell activation modulates retrovirus-mediated gene expression. *Hum Gene Ther.* **1998** Jul 1;9(10):1457-67.
- Reinke P, Prosch S, Kern F, Volk HD.** Mechanisms of human cytomegalovirus (HCMV) (re)activation and its impact on organ transplant patients. *Transpl Infect Dis.* **1999** Sep;1(3):157-64.
- Ritter T, Lehmann M, Volk H.** Improvements in gene therapy: averting the immune response to adenoviral vectors. *BioDrugs.* **2002**;16(1):3-10.
- Ritter T, Risch K, Schroder G, Kolls J, Siegling A, Graser E, Reinke P, Brock J, Lehmann M, Volk HD.** Intragraft overexpression of interleukin-4 is neither sufficient nor essential for tolerance induction to cardiac allografts in a high-responder strain combination. *Transplantation.* **1999** Nov 15;68(9):1427-31.
- Ritter T, Vogt K, Rieck P, Schilling-Schon A, Kolls J, Hartmann C, Volk HD, Pleyer U.** Adenovirus-mediated gene transfer of interleukin-4 to corneal endothelial cells and organ cultured corneas leads to high IL-4 expression. *Exp Eye Res.* **1999** Nov;69(5):563-8.
- Romagnani S.** Type 1 T helper and type 2 T helper cells: functions, regulation and role in protection and disease. *Int J Clin Lab Res.* **1991**;21(2):152-8.
- Roncarolo MG, Levings MK, Traversari C.** Differentiation of T regulatory cells by immature dendritic cells. *J Exp Med.* **2001** Jan 15;193(2):F5-9.
- Roncarolo MG, Levings MK.** The role of different subsets of T regulatory cells in controlling autoimmunity. *Curr Opin Immunol.* **2000** Dec;12(6):676-83.
- Russell JH, Ley TJ.** Lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol.* **2002**;20:323-70.
- Russell, S.R., Hawkins, R.E., and Winter, G.** Retroviral vectors displaying functional antibody fragments. *Nucleic Acids Res.* **1993** 21: 1081 – 1085.
- Sachs DH, Bodine DM, Moulton AD, Pearson DA, Nienhuis AW, Sykes M.** Tolerance induction using autologous bone marrow modified with an allogeneic class I MHC gene. *Transplant Proc.* **1993** Feb;25(1 Pt 1):348-9.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T.** *Molecular Cloning.* Band 1. **1989** Cold Spring Harbor Laboratory Press, Second Edition New York, S.1.82-1.84,

Sawitzki B, Lehmann M, Ritter T, Graser E, Kupiec-Weglinski JW, Volk HD. Regulatory tolerance-mediating T cells in transplantation tolerance. *Transplant Proc.* **2001** May;33(3):2092-3.

Sawitzki B, Lehmann M, Vogt K, Risch K, Brock J, Kupiec-Weglinski JW, Volk HD. Bag-1 up-regulation in anti-CD4 mAb treated allo-activated T cells confers resistance to apoptosis. *Eur J Immunol.* **2002** Mar;32(3):800-9.

Sayegh MH, Akalin E, Hancock WW, Russell ME, Carpenter CB, Linsley PS, Turka LA. CD28-B7 blockade after alloantigenic challenge in vivo inhibits Th1 cytokines but spares Th2. *J Exp Med.* **1995** May 1;181(5):1869-74.

Sayegh MH, Carpenter CB. Role of indirect allorecognition in allograft rejection. *Int Rev Immunol.* **1996**;13(3):221-9.

Sekine Y, Bowen LK, Heidler KM, Van Rooijen N, Brown JW, Cummings OW, Wilkes DS. Role of passenger leukocytes in allograft rejection: effect of depletion of donor alveolar macrophages on the local production of TNF-alpha, T helper 1/T helper 2 cytokines, IgG subclasses, and pathology in a rat model of lung transplantation. *J Immunol.* **1997** Oct 15;159(8):4084-93.

Shannon MF, Himes SR, Coles LS. GM-CSF and IL-2 share common control mechanisms in response to costimulatory signals in T cells. *J Leukoc Biol.* **1995** May;57(5):767-73.

Sharpe AH, Freeman GJ. The B7-CD28 superfamily. *Nature Rev Immunol.* **2002** Feb;2(2):116-26.

Shevach EM, McHugh RS, Piccirillo CA, Thornton AM. Control of T-cell activation by CD4+ CD25+ suppressor T cells. *Immunol Rev.* **2001** Aug;182:58-67.

Shimomura K, Hardy MA, Oluwole SF. Tolerance induction to cardiac allografts by simultaneous or sequential intrathymic inoculation of disparate alloantigens. *Transplantation.* **1995** Oct 27;60(8):806-11.

Shinozaki K, Yahata H, Tanji H, Sakaguchi T, Ito H, Dohi K. Allograft transduction of IL-10 prolongs survival following orthotopic liver transplantation. *Gene Ther* **1999** May;6(5):816-22

Siegling A, Lehmann M, Riedel H, Platzer C, Brock J, Emmrich F, Volk HD. A nondepleting anti-rat CD4 monoclonal antibody that suppresses T helper 1-like but not T helper 2-like intragraft lymphokine secretion induces long-term survival of renal allografts. *Transplantation.* **1994** Feb;57(3):464-7.

Smith DK, Korbitt GS, Suarez-Pinzon WL, Kao D, Rajotte RV, Elliott JF. Interleukin-4 or interleukin-10 expressed from adenovirus-transduced syngeneic islet grafts fails to prevent beta cell destruction in diabetic NOD mice. *Transplantation.* **1997** Oct 15;64(7):1040-9.

Steinbrink K, Graulich E, Kubsch S, Knop J, Enk AH. CD4(+) and CD8(+) anergic T cells induced by interleukin-10-treated human dendritic cells display antigen-specific suppressor activity. *Blood.* **2002** Apr 1;99(7):2468-76.

Steinbrink K, Wolfl M, Jonuleit H, Knop J, Enk AH. Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells. *J Immunol.* **1997** Nov 15;159(10):4772-80.

Stephens LA, Mason D. CD25 is a marker for CD4+ thymocytes that prevent autoimmune diabetes in rats, but peripheral T cells with this function are found in both CD25+ and CD25- subpopulations. *J Immunol.* **2000** Sep 15;165(6):3105-10.

Suzuki T, Tahara H, Narula S, Moore KW, Robbins PD, Lotze MT. Viral interleukin 10 (IL-10), the human herpes virus 4 cellular IL-10 homologue, induces local anergy to allogeneic and syngeneic tumors. *J Exp Med.* **1995** Aug 1;182(2):477-86.

Swain SL, Weinberg AD, English M, Huston G. IL-4 directs the development of Th2-like helper effectors. *J Immunol.* **1990** Dec 1;145(11):3796-806.

Takayama T, Morelli AE, Onai N, Hirao M, Matsushima K, Tahara H, Thomson AW. Mammalian and viral IL-10 enhance C-C chemokine receptor 5 but down-regulate C-C chemokine receptor 7 expression by myeloid dendritic cells: impact on chemotactic responses and in vivo homing ability. *J Immunol.* **2001** Jun 15;166(12):7136-43.

Takayama T, Morelli AE, Robbins PD, Tahara H, Thomson AW. Feasibility of CTLA4Ig gene delivery and expression in vivo using retrovirally transduced myeloid dendritic cells that induce alloantigen-specific T cell anergy in vitro. *Gene Ther.* **2000** Aug;7(15):1265-73.

Takayama T, Tahara H, Thomson AW. Transduction of dendritic cell progenitors with a retroviral vector encoding viral interleukin-10 and enhanced green fluorescent protein allows purification of potentially tolerogenic antigen-presenting cells. *Transplantation.* **1999** Dec 27;68(12):1903-9.

Takeuchi T, Lowry RP, Konieczny B. Heart allografts in murine systems. The differential activation of Th2-like effector cells in peripheral tolerance. *Transplantation.* **1992** Jun;53(6):1281-94.

Tashiro H, Shinozaki K, Yahata H, Hayamizu K, Okimoto T, Tanji H, Fudaba Y, Yamamoto H, Fan X, Ito H, Asahara T. Prolongation of liver allograft survival after interleukin-10 gene transduction 24-48 hours before donation. *Transplantation.* **2000** Jul 27;70(2):336-9.

Taylor PA, Lees CJ, Blazar BR. The infusion of ex vivo activated and expanded CD4(+)CD25(+) immune regulatory cells inhibits graft-versus-host disease lethality. *Blood.* **2002** May 15;99(10):3493-9.

Tejani A, Emmett L. Acute and chronic rejection. *Semin Nephrol.* **2001** Sep;21(5):498-507.

Thornton AM, Shevach EM. Suppressor effector function of CD4+CD25+ immunoregulatory T cells is antigen nonspecific. *J Immunol.* **2000** Jan 1;164(1):183-90.

Van Parijs L, Abbas AK. Homeostasis and self-tolerance in the immune system: turning lymphocytes off. *Science.* **1998** Apr 10;280(5361):243-8.

Vasilakos JP, Michael JG. Herpes simplex virus class I-restricted peptide induces cytotoxic T lymphocytes in vivo independent of CD4+ T cells. *J Immunol.* **1993** Mar 15;150(6):2346-55.

Waldmann TA. The IL-2/IL-2 receptor system: a target for rational immune intervention. *Trends Pharmacol Sci.* **1993** May;14(5):159-64.

Walther W, Stein U. Viral vectors for gene transfer: a review of their use in the treatment of human diseases. *Drugs.* **2000** Aug;60(2):249-71.

Weis M, von Scheidt W. Cardiac allograft vasculopathy: a review. *Circulation.* **1997** Sep 16;96(6):2069-77.

Williams A, Peh CA, Elliott T. The cell biology of MHC class I antigen presentation. *Tissue Antigens.* **2002** Jan;59(1):3-17.

Witzke O, Spriewald BM, Ensminger SM, Wood KJ. T cell Targets for Tolerance Induction to Alloantigens: Strategies and Mechanisms. *Transplantationsmedizin,* **1998.** 10: p. 168-179.

Wood KJ, Prior TG. Gene therapy in transplantation. *Curr Opin Mol Ther.* **2001** Aug;3(4):390-8.

Yamada A, Kishimoto K, Dong VM, Sho M, Salama AD, Anosova NG, Benichou G, Mandelbrot DA, Sharpe AH, Turka LA, Auchincloss H Jr, Sayegh MH. CD28-independent costimulation of T cells in alloimmune responses. *J Immunol.* **2001** Jul 1;167(1):140-6.

Yang Z, Chen M, Wu R, Fialkow LB, Bromberg JS, McDuffie M, Naji A, Nadler JL. Suppression of autoimmune diabetes by viral IL-10 gene transfer. *J Immunol.* **2002** Jun 15;168(12):6479-85.

Zeidler R, Eissner G, Meissner P, Uebel S, Tampe R, Lazis S, Hammerschmidt W. Downregulation of TAP1 in B lymphocytes by cellular and Epstein-Barr virus-encoded interleukin-10. *Blood.* **1997** Sep 15;90(6):2390-7.

Zuo Z, Wang C, Carpenter D, Okada Y, Nicolaidou E, Toyoda M, Trento A, Jordan SC. Prolongation of allograft survival with viral IL-10 transfection in a highly histoincompatible model of rat heart allograft rejection. *Transplantation.* **2001** Mar 15;71(5):686-91.

Anhang

Publikationen und Kongressteilnahmen

Publikationen :

Ritter T, Brandt C, Prosch S, Vergopoulos A, Vogt K, Kolls J, Volk HD.

Stimulatory and inhibitory action of cytokines on the regulation of hCMV-IE promoter activity in human endothelial cells.

Cytokine. 2000 Aug;12(8):1163-70.

Hammer MH, Flugel A, Seifert M, Lehmann M, Brandt C, Volk HD, Ritter T.

Potential of allospecific gene-engineered T cells in transplantation gene therapy: specific T cell activation determines transgene expression in vitro and in vivo.

Hum Gene Ther. 2000 Jun 10;11(9):1303-11.

C. Doebeis, T. Ritter, C. Brandt, B. Schönberger, H.-D. Volk and M. Seifert

Efficient in vitro transduction of epithelial cells and keratinocytes with improved adenoviral gene transfer for the application in skin tissue engineering.

Transplant Immunology 9, 2002, 13: 1189-1199

Brandt C., Yang J., Hammer M.H., Sawitzki B., Vogt K., Volk H.D., Ritter T.

vIL-10 overexpressing T-lymphocytes inhibit the proliferation and IFN- γ production of naïve responder T cells in vitro but fail to prevent allograft rejection after adoptive transfer.

in preparation

Kongressteilnahmen; Vorträge* und Poster:

Brandt C, Ritter T, Prosch S, Vergopoulos A, Vogt K, Kolls J, Volk HD.

Stimulatory and inhibitory action of cytokines on the regulation of hCMV-IE promoter activity in human endothelial cells.

“6th Symposium on Gene Therapy”, Mai 1998 Max-Delbrück-Center, Berlin-Buch

Brandt C*, Ritter T, Prosch S, Vergopoulos A, Vogt K, Kolls J, Volk HD.

Stimulatory and inhibitory action of cytokines on the regulation of hCMV-IE promoter activity in human endothelial cells.

European Students Conference, Oktober 1998 Charite, Berlin

Brandt C, Sawitzki B, Hammer MH, Volk HD, Ritter T.

Rat T-lymphocytes expressing viral Interleukin-10 after retrovirus-mediated gene transfer modulate allogenic immune responses.

“7th Basic Sciences Symposium of the Transplantation Society”, August 2001, Thun, Schweiz

Brandt C, Sawitzki B, Hammer MH, Volk HD, Ritter T.

Rat T-lymphocytes expressing viral Interleukin-10 after retrovirus-mediated gene transfer modulate allogenic immune responses.

“9th Meeting of the European Society of Gene Therapy”, November 2001, Antalya, Turkey

Brandt C, Hammer MH, Yang J, Sawitzki B, Volk HD, Ritter T.

vIL-10 overexpressing T-lymphocytes inhibit the proliferation and IFN- γ production of naive responder cells but fail to prevent allograft rejection after adoptive transfer.

American Transplant Congress, April 2002, Washington, USA

Patent: “Gen-modifizierte T-Zellen, Verfahren zu ihrer Herstellung und ihre Anwendung”

Ritter T., Volk H.-D., Hammer M., Brandt C., Schröder G., Lehmann M., Flügel A.

Lebenslauf

Nachname:	Brandt
Vorname:	Christine
Nationalität:	deutsch
Geburtsdatum:	28.03.1969
Geburtsort:	Einbeck
Familienstand:	ledig
Adresse:	Feurigstr.61, 10827 Berlin
	Tel.: +49-30-78 71 61 86
	e-mail: christhom9@compuserve.de
Eltern:	Brandt Karl
	Brandt Anneliese

Schul Ausbildung

1981 – 1988	Paul-Gerhardt-Gymnasium, Dassel
Abschluss	Allgemeine Hochschulreife

Hochschulausbildung

1988 - 1991	Studium der Kommunikationswissenschaften an der TU-Berlin
1992 - 1998	Studium der Biologie an der Humboldt-Universität zu Berlin
Abschluss	Diplom-Biologin
Okt.1998 - März 1999	Forschungsstipendium am Institut für Medizinische Immunologie, Humboldt-Universität zu Berlin, Charité
Seit April 1999	Promotion am Institut für Medizinische Immunologie, Humboldt-Universität zu Berlin, Charité
Stipendien	Nachwuchsförderungsstipendium (NaFöG) April 2000 – März 2001
	Boehringer-Ingelheim Reisestipendium, Okt.-Dez. 2002 Cornell-Universität, New York

Danksagung

Als erstes möchte ich dem gesamten Institut für Medizinische Immunologie meinen herzlichsten Dank aussprechen. Ich habe in den letzten 4 Jahren einen Grossteil meiner Zeit im Ida-Simon-Haus verbracht. Ohne die vielen herzlichen und hilfsbereiten Mitarbeiter hätte niemals die außergewöhnliche Atmosphäre entstehen können, in der neben der Forschung immer noch der Augenblick Zeit für ein persönliches Gespräch übrig blieb.

Mein ganz besonderer Dank gilt Dr. Thomas Ritter und Prof. Hans-Dieter Volk. Besonders Thomas Ritter, der mich von Beginn meiner Diplomarbeit bis zur Beendigung meiner Dissertation hervorragend betreut, beraten und motiviert hat. Es war eine sehr schöne und lehrreiche Zusammenarbeit. Und wenn einmal alle Wege in die Sackgasse zu führen schienen, war immer der „Chef“ mit einer zündenden Idee zur Stelle.

Eine der wichtigsten Personen in der Immunologie war und ist Brit, mit der ich schon 1992 für die Biologie-Prüfungen an der HU gebüffelt habe. Wäre Brit nicht gewesen, wer weiß, ob ich jetzt diese Zeilen schreiben würde. Die Doktoranden-Zeit ist vorbei, die Freundschaft mit Brit ist eine der vielen Dinge, die obwohl ich nicht mehr im Haus bin, immer bleiben werden.

Markus Hammer hat mich zu Beginn unserer Zusammenarbeit viel Nerven gekostet, aber ich habe seine unkonventionellen Ideen sehr schätzen gelernt, seine kaotische aber dennoch konstruktive Arbeitsweise bis zum Schluss kritisiert und werde die vielen anregenden Diskussionen nicht vergessen.

Mein Dank gilt auch Birgit Sawitzki, die mir jederzeit mit viel Schwung und Elan und sehr guter fachlicher Kompetenz zur Seite gestanden hat.

Aber auch alle anderen Mitarbeiter, besonders Katrin Vogt, die eine erstklassige, fachliche Unterstützung in allen molekularbiologischen Fragen gewesen ist. Cornelia Doebis, Martina Schröder und Mechthild Jung möchte ich für die schöne Zeit danken.

Danke auch an Elke Effenberg und Heinz Tanzmann, ohne die beiden würden wichtige tragende Säulen des Institutes verloren gehen.

Martina Seifert und Gerald Grütz hatten immer ein offenes Ohr für alle Probleme und konnten so oft durch einen guten Rat die Forschung vorantreiben.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen lieben Eltern, die mich in den letzten 10 Jahren aus vollem Herzen unterstützt haben und somit diese Arbeit ermöglichten.

„Last but not least“ gab und gibt es ein Leben außerhalb des Labor, lieber Thomas ich danke Dir vor allem für die Geduld, die Du in dem letzten halben Jahr, das vordergründig durch die Entstehung dieser Arbeit geprägt war, aufgebracht hast.

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Dissertation von mir selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt wurde.

Berlin, den 11.09.2002

Christine Brandt